



Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis
Departamento de Bioquímica Vegetal Y Biología Molecular
Universidad de Sevilla – CSIC

REGULACIÓN REDOX DE LA SÍNTESIS DE ALMIDÓN EN CEREALES

Trabajo realizado para optar al grado de Doctor por la
Universidad de Sevilla por la licenciada

Beatriz Cano Ruiz

Director de la Tesis

Dr. Francisco Javier Cejudo Fernández
Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a una beca predoctoral adjunta a un proyecto de excelencia (P06-CVI-01450) concedida por la Junta de Andalucía durante el periodo comprendido entre Agosto del 2007 y Julio del 2011.

En primer lugar, quisiera agradecer a mi director de tesis, el Dr. Francisco Javier Cejudo, y al Dr. José María Romero por confiar en mí y concederme la oportunidad de llevar a cabo este trabajo en el que tanto he aprendido. Gracias también a mi director de tesis por haber cogido las riendas de este barco a la deriva, su atención, consejos y apoyo han permitido que llegue a buen puerto.

Y cómo no, agradecer al ahora Dr. Antonio Javier Moreno aquella llamada el verano de 2007 que me llevó a embarcarme en esta etapa tan importante en mi vida.

También quisiera agradecer su colaboración a todos aquellos que han participado directamente en la obtención de los resultados presentados en este trabajo: a la Dra Pilar Carbonero, de la Universidad Politécnica de Madrid, por proporcionar el anticuerpo anti-SUS utilizado en este trabajo y al Dr. Manuel Aguilar, del CIFA Las Torres-Tomejil, por el cultivo en sus instalaciones del arroz utilizado en este trabajo. Por supuesto, agradecer su colaboración al personal técnico del IBVF: a Pablo por hacerle siempre un hueco y cuidar de mis trigos y arroces, a Rocío Rodríguez y Carlos Parejo por el análisis de las numerosas muestras en los servicios de análisis de proteínas y cromatografía, respectivamente.

Agradecer enormemente a mis compañeros de laboratorio, pasados y presentes, todo el tiempo que me habéis dedicado, por enseñarme a desenvolverse en el laboratorio y en este mundillo científico tan especial, por las numerosas técnicas que he aprendido, por vuestros consejos, por animarme en los momentos de flaqueza y por los buenos momentos que hemos pasado tanto dentro como fuera del laboratorio. Gracias por el buen ambiente que ha habido siempre en el L12, de trabajo, dedicación e ilusión por conseguir ese resultado que a veces se resiste. Así, empezando por los que ya marcharon agradecer al incombustible Pablo su acogida en el laboratorio y dedicarme su tiempo en mis primeros días, a Kerstin por su amistad, por los buenos momentos que hemos pasado y por todo lo que me ha enseñado tanto laboral como personalmente (ya lo sabes: de mayor quiero ser como tú!!), a Belén por enseñarme tanto y tanto y demostrarme que todo esfuerzo tiene su recompensa, eres una campeona!! y a Manolo por ser el que me ha aguantado todo el tiempo, con mis bromas y mis mosqueos, y por abrir todos los días las calles). Y siguiendo con los presentes, a Maricruz por su ayuda, aún con mil cosas en la cabeza siempre me hacías un huequito y siempre con el protocolo adecuado, a Anna por su ayuda y por preocuparse siempre por cómo iban las cosas,

a Julia porque ha sido un placer compartir esta etapa con una compañera con tan buena energía, las largas jornadas se hacen más llevaderas con una sonrisa, a Leo y Belén N. por vuestro apoyo en la recta final, a Vicky por heredar este rompecabezas, mucha suerte!! y a Juan, que aunque no hemos coincidido mucho tiempo, tu Tesis sí que ha estado siempre con nosotros. Como componente del L12 y sobretodo como amigo, a Nando por los buenos momentos que hemos pasado, llenos de confianzas y de bromas, y por los que vendrán, que aunque te quedes en Finlandia seguirás siendo 'MY FRIEND'.

A los componentes de mi otro laboratorio, el L13: Isa, Fatiza, Eva, Tamara, Ana (ahora L14), Marina, Raquel, Tomás, Fran, Tere, Fede y José María. Por vuestro apoyo y porque me he sentido muy querida por vosotros, gracias. A Isa por ofrecerte siempre a echar una mano, por preocuparte por mí, por tus consejos y por muchas cosas más, GRACIAS, cuenta conmigo siempre. A Fatiza por tener un corazón tan grande, eres un Sol. A Marina por *as conversas em português*, por entenderme y por no olvidarte de mí aun en la distancia.

Agradecer a mis compis de *tupper* en el parque Emilio, Paula, Tania, Sandy, Yoli, Julia y Belén que hayáis convertido cada día de trabajo en un día entre amigos, además de los conocimientos en culinaria adquiridos, que no todo iba a ser ciencia. Os echo de menos!! A Emilio y Paula, por haber estado siempre ahí, dentro y fuera del trabajo, y por haber sido superimportantes para mí en esta etapa, muchísimas gracias por todo. A Tania, mi otro yo, porque desde que te fuiste me falta un cachito.

Y a todos los compañeros del IBVF que de una u otra forma me han ayudado a lograr este objetivo y han compartido esos pequeños momentos de pasillo que sacan sonrisas y animan el día: Inma, Irene, Isa, Rosana, Gloria, Rafa, Bárbara, Victoria, Mireia, Fran, Mauro, Fernando, Baldo, Luci, Rafa, Nuria,...

Y esta larga etapa no hubiese sido lo mismo sin unos buenos amigos con los que desconectar. Por eso, enormemente agradecida a todos los Super-riquís: Juanan, Juanma, Zaida, Andrea, Patri, Cecilia, Jorge, Víctor, Josef, Rocío y Maribel, además de los ya mencionados. Gracias por tantos buenos momentos, fiestas, excursiones, viajes, cervecitas...lo he pasado en grande con vosotros. Agradecer a mi querida Chichí su apoyo, su amistad y todos esos momentos tan divertidos que hemos compartido (no puedo dejar de sonreír recordándolos). Gracias también a mi familia de aquí por su apoyo y cuidar de mí todo este tiempo que estuve fuera de casa, y muy especialmente a mi tía Duvi que fue una segunda madre para mí y a mi prima Conchi, inseparables últimamente, por "sufrir" mis altibajos de tesis día a día, por tener siempre una sonrisa y por ayudarme en todo lo que puede y más. A Antonio, el primero en creer que lo conseguiría y me apoyó siempre, no puedo decir otra cosa que gracias por TODO. A mis amigas Cande y MariCarmen porque sé que me apoyan siempre.

Agradecer por supuesto a mis padres todo su cariño y, aunque a veces no me entiendan mucho, su ayuda y su apoyo. Gracias también por la educación que me habéis dado, la constancia y el esfuerzo lo aprendí de vosotros. A mi hermano porque sé, aunque no me lo diga, que me apoya y me quiere. A mi abueli por su cariño y su apoyo siempre.

Y gracias a Huascar porque tu cariño, tu paciencia, tu apoyo, tu comprensión, tus ánimos y tus canciones han hecho mucho más llevadera esta última etapa. Contigo todos los días son especiales.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	1
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	4
ABREVIATURAS	7
I. INTRODUCCIÓN.....	11
I.1. LOS CEREALES	13
I.1.1. Estructura y composición química de las semillas de cereales	14
I.1.2. Ciclo de vida	18
I.1.2.1. Desarrollo	18
I.1.2.2. Germinación	20
I.1.3. Estrés oxidativo durante el desarrollo y germinación de las semillas de cereales	21
I.1.4. Regulación redox en semillas de cereales.....	23
I.1.5. Sistema NTR/Tiorredoxina en semillas de cereales	24
I.1.5.1. NTRC	26
I.1.6. Metabolismo del almidón	29
I.1.6.1. Síntesis de almidón en semillas de cereales	30
I.1.6.2. Degradación del almidón de reserva	34
I.1.6.3. Sacarosa sintasa	35
I.1.6.3.1. Familia génica y patrón de expresión de los genes <i>Sus</i>	37
I.1.6.3.2. Localización subcelular de la SUS	39
I.1.6.3.3. Características físico-químicas y bioquímicas de la actividad enzimática	41
I.1.6.3.4. Regulación de la actividad SUS.....	42
I.2. OBJETIVOS	43
II.MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
II.1. MATERIAL VEGETAL	47
II.1.1. Esterilización de las semillas	47
II.1.2. Germinación de las semillas y condiciones de cultivo	47
II.1.3. <i>Nicotiana benthamiana</i>	48
II.2. BACTERIAS	49
II.2.1. Estirpes utilizadas.....	49
II.2.2. Cultivo en medio líquido y sólido.....	49
II.2.3. Obtención de células competentes.....	49
II.3. MÉTODOS DE MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE DNA.....	50
II.3.1. Clonación de cDNAs	50
II.3.2. Métodos de transformación genética.....	51
II.3.3. Aislamiento de plásmidos de <i>E.coli</i>	51
II.3.4. Aislamiento de DNA total de tejidos vegetales.....	51
II.3.5. Electroforesis de DNA en geles de agarosa	52
II.3.6. Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa	52

II. 3.7. Restricción del DNA.....	52
II.3.8. Ligación de fragmentos de DNA.....	53
II.3.9. Amplificación de fragmentos de DNA por PCR	53
II.3.10. Secuenciación automática de DNA	53
II.4. MÉTODOS DE PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE RNA Y cDNA	53
II.4.1. Tratamiento del material	53
II.4.2. Aislamiento de RNA de plantas.....	54
II.4.2.1. Aislamiento de RNA de hojas.....	54
II.4.2.2. Aislamiento de RNA de endospermo.....	54
II.4.3. Aislamiento de RNA Poli(A) ⁺	55
II.4.4. Cuantificación del RNA.....	55
II.4.5. Electroforesis de RNA.....	55
II.4.6. Hibridación de RNA mensajero con sondas radiactivas	56
II.4.7. Preparación de cDNA por RT-PCR	57
II.4.8. RT-PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).....	57
II.4.9. Amplificación de los extremos del cDNA (RACE).....	59
II.5. MÉTODOS DE EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	60
II.5.1. Expresión de proteínas en <i>E. coli</i>	60
II.5.2. Obtención de extractos de <i>E. coli</i>	61
II.5.3. Expresión transitoria de proteínas en hojas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	62
II.5.4. Purificación de proteínas recombinantes	63
II.6. PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.....	63
II.6.1. Extractos totales de proteína	63
II.6.2. Cuantificación de extractos proteicos.....	64
II.6.3. Precipitación de proteínas	64
II.6.4. Cromatografía en columnas.....	64
II.6.4.1. Filtración en gel	64
II.6.4.2. Cromatografía de afinidad	65
II.6.5. Electroforesis de proteínas	66
II.6.5.1. SDS-PAGE	66
II.6.5.2. Electroforesis bidimensional.....	66
II.6.5.3. Marcadores de masa molecular para las electroforesis de proteínas.....	67
II.6.6. Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida.....	67
II.6.7. Espectrofotometría de masas e identificación de proteínas	67
II.7. MÉTODOS INMUNOLÓGICOS	68
II.7.1. Análisis mediante <i>Western blot</i>	68
II.7.2. Inmunolocalización	69
II.7.3. Purificación de anticuerpos.....	70
II.7.3.1. Purificación de anticuerpos en Proteína A.....	70
II.7.3.2. Purificación del anticuerpo anti-NTRC en columnas NHS.....	70
II.7.4. Inmunoprecipitación	71
II.8. ENSAYOS ENZIMÁTICOS	71
II.8.1. Determinación de la actividad Sacarosa Sintasa	71
II.9. HERRAMIENTAS DE BIOINFORMÁTICA.....	73

III. RESULTADOS	75
III.1. ESTUDIO DE NTRC EN ENDOSPERMO DE SEMILLAS DE CEREALES.....	77
III.1.1. Patrón de expresión de NTRC en endospermo	77
III.1.1.1. Patrón de expresión de NTRC en arroz (<i>Oryza sativa</i>).....	79
III.1.1.2. Expresión de NTRC en trigo (<i>Triticum aestivum</i>)	82
III.1.2. Estudios para la identificación de NTRC en endospermo de semillas de cereales	88
III.1.3. Localización de NTRC en endospermo de semillas de cereales	96
III.2. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS QUE INTERACCIONAN CON NTRC EN ENDOSPERMO DE SEMILLAS DE CEREALES.....	99
III.2.1. Identificación de proteínas diana de NTRC en endospermo de semillas de arroz (<i>Oryza sativa</i>)	100
III.2.1.1. Dianas identificadas por cromatografía de afinidad.....	100
III.2.1.2. Dianas de NTRC identificadas mediante inmunoprecipitación.....	106
III.2.1.3. Comparación de resultados de ambos métodos	110
III.2.2. Identificación de proteínas diana de NTRC en endospermo de semillas de trigo (<i>Triticum aestivum</i>).....	113
III.2.3. Comparación de los resultados de arroz y trigo	118
III.3. CARACTERIZACIÓN DE TRES ISOFORMAS DE SACAROSA SINTASA DE ARROZ.....	120
III.3.1. Análisis del patrón de expresión de los genes <i>Sus1</i> , <i>Sus2</i> y <i>Sus3</i> durante el desarrollo de las semillas de arroz	120
III.3.1.1. Expresión de los genes <i>Sus</i> de arroz en condiciones de estrés abiótico.....	124
III.3.2. Clonación de los cDNAs de SUS de arroz para su expresión en <i>E. coli</i>	126
III.3.3. Pruebas de expresión de las SUS de arroz en <i>E. coli</i>	127
III.3.4. Clonación de los cDNAs de SUS de arroz para la expresión en <i>N. benthamiana</i>	128
III.3.5. Expresión de las SUS de arroz en <i>N. benthamiana</i>	130
III.3.6. Purificación de las isoformas OsSUS1, OsSUS2 y OsSUS3	131
III.3.7. Caracterización bioquímica de OsSUS1, OsSUS2 y OsSUS3	133
III.3.6.1. Estudio de la regulación redox de la actividad SUS.....	139
III.3.8. Actividad sacarosa sintasa en endospermo de arroz. Regulación redox	142
IV. DISCUSIÓN	144
IV.1. El gen <i>NtrC</i> se expresa en endospermo de semillas de cereales dando lugar a una enzima con características peculiares	146
IV.2. La identificación de dianas de NTRC en endospermo de semillas de cereales sugiere diferentes funciones de la enzima	149
IV.3. Sacarosa sintasa: posible diana de NTRC en endospermo de semillas de cereales	159
IV.3.1. El patrón de expresión de los genes <i>OsSus1</i> , <i>OsSus2</i> y <i>OsSus3</i> durante el desarrollo de la semilla no se altera en condiciones de estrés salino.	160
IV.3.2. Nuevo método para la producción de sacarosa sintasa recombinante.....	162
IV.3.3. Las isoformas OsSUS1, OsSUS2 y OsSUS3 difieren en sus propiedades bioquímicas	164
IV.3.4. La actividad SUS está modulada por el estado redox	166
V. CONCLUSIONES	169
VI. BIBLIOGRAFÍA	173

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura I.1. Composición histológica de un grano de trigo. Adaptado de (Surget and Barron, 2005)	15
Figura I.2. Micrografía electrónica de barrido de una sección transversal del salvado de un grano de trigo que muestra las capas de tejido que lo componen	16
Figura I.3. Micrografía electrónica de barrido de endospermo de maíz en desarrollo que muestra las paredes celulares (PC), los gránulos de almidón (GA) y los cuerpos proteicos (CP). Adaptado de (Sabelli and Larkins, 2009)	17
Figura I.4. Fases del desarrollo del endospermo de cereales	18
Figura I.5. Esquema de los procesos asociados a la germinación de las semillas de cereales	20
Figura I.6. Función señalizadora de ROS en semillas de cereales	22
Figura I.7. Mecanismo de acción de las tiorredoxinas	24
Figura I.8. Sistemas de tiorredoxinas	25
Figura I.9. Transferencia del poder reductor a través de NTRC	27
Figura I.10. Resumen de las funciones de NTRC en la regulación redox del cloroplasto	29
Figura I.11. Rutas de síntesis de almidón en células fotosintéticas (A) y en células heterotróficas (B)	32
Figura I.12. Modelo de las rutas de degradación de almidón en células fotosintéticas	34
Figura I.13. Regulación de la actividad sacarosa sintasa (SUS) según la localización subcelular	40
Figura II.1. Desarrollo y clasificación de las semillas de arroz	477
Figura II.2. Semillas de trigo en desarrollo hasta los 30 días post-antesis (dpa)	488
Figura II.3. Descripción general de la técnica RLM-RACE	599
Figura II.4. Cromatograma de separación y cuantificación de UDP, UDPG, ADP y ADPG obtenido en HPLC	722
Figura III.1.1. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de NTRC de diferentes organismos	799
Figura III.1.2. Árbol filogenético de NTRC de diferentes organismos	799
Figura III.1.3. Secuencia de cDNA del gen <i>NtrC</i> de arroz y su traducción a proteína	80
Figura III.1.4. Expresión de OsNTRC durante el desarrollo de semillas de arroz	81
Figura III.1.5. Secuencia parcial del cDNA que codifica NTRC de trigo	822
Figura III.1.6. Alineamiento de una EST de NTRC de trigo con la secuencia completa del cDNA de NTRC de cebada	844
Figura III.1.7. Secuencia de cDNA del gen <i>TaNtrC</i> de trigo y su traducción a proteína	866
Figura III.1.8. Expresión de NTRC durante el desarrollo de semillas de trigo	877
Figura III.1.9. Análisis <i>Western blot</i> de semillas y hoja de arroz con un anticuerpo anti-NTRB	888
Figura III.1.10. Efecto del tratamiento con agentes reductores sobre la NTRC reconocida en endospermo de arroz	899
Figura III.1.11. Expresión de NTRC en semillas germinadas de arroz	90
Figura III.1.12. SDS-PAGE bidimensional de la cromatografía de afinidad para la identificación de NTRC de endospermo de semillas de arroz	91
Figura III.1.13. Secuencia del fragmento del cDNA de NTRC amplificado en endospermo de semillas de arroz	92
Figura III.1.14. Comparación de los transcritos de NTRC en endospermo y hoja de arroz	93
Figura III.1.15. Localización de los cebadores para la clonación de los extremos del cDNA mediante RACE	944
Figura III.1.16. Amplificación de los extremos 5' y 3' del cDNA para NTRC mediante RLM-RACE	955
Figura III.1.17. Extremo 3' de los cDNAs de NTRC sintetizados a partir de mensajeros de endospermo y hoja de arroz	955
Figura III.1.18. Inmunolocalización de NTRC en semillas de trigo	977
Figura III.1.19. Inmunolocalización de AGPasa en semillas de trigo	988

Figura III.2.1. Esquema de la formación de un complejo intermediario estable entre el mutante monocistéinico NTRC(C380S) y su proteína diana	100
Figura III.2.2. Perfil de elución de las cromatografías de afinidad realizadas con extractos de endospermo aislado de semillas de arroz en desarrollo	102
Figura III.2.3. Separación electroforética de las proteínas eluidas de la cromatografía de afinidad en endospermo de semillas de arroz	103
Figura III.2.4. Separación electroforética de las proteínas de las fracciones obtenidas en la inmunoprecipitación de NTRC de endospermo de semillas de arroz	1066
Figura III.2.5. Identificación de NTRC en las proteínas inmunoprecipitadas de endospermo de semillas de arroz	1077
Figura III.2.6. Análisis mediante electroforesis bidimensional de las posibles proteínas diana de NTRC inmunoprecipitadas de endospermo de semillas de arroz	1088
Figura III.2.7. Perfil de elución de la cromatografía de afinidad realizada con extractos de endospermo aislado de semillas de trigo en desarrollo.....	114
Figura III.2.8. Separación electroforética de de las proteínas eluidas mediante cromatografía de afinidad de endospermo de semillas de trigo.....	1155
Figura III.3.1. Organización estructural de los exones e intrones de los genes <i>Sus</i> de <i>Arabidopsis</i> y arroz	121
Figura III.3.2. Árbol filogenético de las secuencias aminoácidas derivadas de los genes <i>Sus</i> de cereales	122
Figura III.3.3. Expresión de los genes <i>OsSus1</i> , <i>OsSus2</i> y <i>OsSus3</i> en semillas de arroz en desarrollo	123
Figura III.3.4. Efecto de la salinidad sobre la expresión de los genes <i>OsSus1</i> , <i>OsSus2</i> y <i>OsSus3</i> de semillas de arroz	1255
Figura III.3.5. Prueba de expresión de <i>OsSUS3</i> en las estirpes de <i>E. coli</i> XL1-Blue y BL21 a 20°C	1288
Figura III.3.6. Expresión en <i>N. benthamiana</i> de las isoformas <i>OsSUS</i> clonadas en los vectores pGWB8 y pGWB9	130
Figura III.3.7. Patrón de expresión de las isoformas <i>OsSUS</i> en <i>N. benthamiana</i> tras la agroinfiltración	13131
Figura III.3.8. Purificación de <i>OsSUS2</i> sobreexpresada en <i>N. benthamiana</i>	132
Figura III.3.9. Purificación de <i>OsSUS1</i> , <i>OsSUS2</i> y <i>OsSUS3</i>	133
Figura III.3.10. Cromatogramas de separación y cuantificación de UDP y UDPG obtenido en HPLC....	134
Figura III.3.11. Actividad sacarosa sintasa (rotura) de <i>OsSUS1</i> , <i>OsSUS2</i> y <i>OsSUS3</i>	1355
Figura III.3.12. Efecto del pH sobre la actividad sacarosa sintasa de las isoformas <i>OsSUS1</i> , <i>OsSUS2</i> y <i>OsSUS3</i>	1366
Figura III.3.13. Constantes cinéticas de las isoformas <i>OsSUS1</i> , <i>OsSUS2</i> y <i>OsSUS3</i>	1377
Figura III.3.14. Inhibición por sustrato (fructosa) de la actividad de las isoformas <i>OsSUS1</i> , <i>OsSUS2</i> y <i>OsSUS3</i>	1388
Figura III.3.15. Utilización de ADP, UDP, ADPG y UDPG como sustrato por las isoformas <i>OsSUS1</i> , <i>OsSUS2</i> y <i>OsSUS3</i>	1399
Figura III.3.16. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de <i>SUS</i> en plantas	1410
Figura III.3.17. Efecto de agentes reductores u oxidantes sobre la actividad de las isoformas <i>OsSUS1</i> , <i>OsSUS2</i> y <i>OsSUS3</i>	141
Figura III.3.18. Efecto de agentes oxidantes y reductores sobre la actividad <i>SUS</i> de endospermo y hoja de arroz	143
Figura IV.1. Posible participación de NTRC en la regulación redox de la síntesis y degradación del almidón en endospermo de semillas de cereales.....	15252

Tabla I.1. Producción mundial de cereales.	13
Tabla II.1. Estirpes de <i>E. coli</i> utilizadas en este trabajo.	499
Tabla II.2. Secuencias de oligonucleótidos usados para la síntesis de las sondas radiactivas.	566
Tabla II.3. Secuencias de oligonucleótidos usados en experimentos de qPCR.	588
Tabla II.4. Secuencias de oligonucleótidos usados en experimentos de RACE.	60
Tabla II.5. Construcciones realizadas para la expresión de proteínas en <i>E. coli</i>	60
Tabla II.6. Construcciones realizadas para la expresión de proteínas en <i>N. benthamiana</i>	622
Tabla III.2.1. Posibles dianas de NTRC en endospermo de semillas de arroz identificadas mediante cromatografía de afinidad	104
Tabla III.2.2. Posibles dianas de NTRC en endospermo de semillas de arroz identificadas mediante inmunoprecipitación.	1099
Tabla III.2.3. Clasificación de las posibles proteínas diana de NTRC identificadas en endospermo de arroz según su función.	110
Tabla III.2.4. Posibles dianas de NTRC en endospermo de semillas de arroz identificadas mediante cromatografía de afinidad e inmunoprecipitación	113
Tabla III.2.5. Posibles dianas de NTRC en endospermo de semillas de trigo identificadas mediante cromatografía de afinidad	1166
Tabla III.2.6. Clasificación de las posibles proteínas diana de NTRC identificadas de endospermo de trigo según su función	1177
Tabla III.2.7. Posibles proteínas diana de NTRC identificadas en común en endospermo de arroz y de trigo, clasificadas según su función.	1199
Tabla III.3.1. Detalles de oligonucleótidos utilizados y tamaño de los cDNAs clonados; y número de residuos, peso molecular y punto isoelectrico de las proteínas resultantes de la clonación en el vector pQE30.	1266
Tabla III.3.2. Detalles de oligonucleótidos utilizados y tamaño de los cDNAs clonados; y número de residuos, peso molecular y punto isoelectrico de las proteínas resultantes de la clonación en los vectores pGWB8 y pGWB9.	1299

ABREVIATURAS

3-PGA	3-fosfoglicerato
A	Absorbancia
aa	Aminoácido
ABA	Ácido Abscísico
ADP	Adenosín-5'-difosfato
ADPG	ADP-glucosa
AGPasa	ADP-glucosa pirofosforilasa
ATP	Adenosín-5'-trifosfato
BCIP	5-Bromo-4-cloro-indolil-fosfato
Bis-acrilamida	N,N', -bis-metilen-acrilamida
BLAST	Búsqueda de similitud de secuencias
BSA	Seroalbúmina bovina
BT1	Transportador <i>Brittle-1</i>
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CDP	Citosín-5'-difosfato
CDS	<i>Coding DNA sequence</i>
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAsa	Desoxirribonucleasa
dNTP	Desoxirribonucleósido 5'-trifosfato
DO	Densidad óptica
dpa	Días post-antesis
dTDP	2'-desoxitimidín-5'-difosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EST	<i>Expression sequence tags</i>
FAD	Flavín Adenín Dinucleótido
Fd	Ferredoxina
FNR	Ferredoxina NADP ⁺ oxidoreductasa
FTR	Ferredoxina tioredoxina reductasa
g	Aceleración de la gravedad terrestre
g	Gramos
GAs	Giberelinas
GBSS	Almidón sintasa unida a gránulo
GDP	Guanosín-5'-difosfato
Glc-1-P	Glucosa-1-fosfato
Glc-6-P	Glucosa-6-fosfato
h	Hora
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacil-(1)]
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IBVF	Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis
IPTG	isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
K_M	Constante de Michaelis-Menten
L	Litro
LB	Medio Luria-Bertani
MES	Ácido 2-morfolinoetanosulfónico monohidrato
min	Minuto

MOPS	Ácido-3-(N-morfolino) propanosulfónico
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NAD(P)⁺	Nicotinamida-adenín-dinucleótido-fosfato
NAD(P)H	Nicotinamida-adenín-dinucleótido-fosfato reducido
NBT	Nitroblue tetrazolium
NTR	NADPH tiorredoxina reductasa
p/v	Relación peso/volumen
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PGI	Glucosa-6-fosfato isomerasa
PGM	Fosfoglucomutasa
Pi	Fosfato inorgánico
pI	Punto isoeléctrico
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PPI	Pirofosfato
Prx	Peroxirredoxina
Psi	<i>pounds per square inch</i>
qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real
RNA	Ácido ribonucleico
RNAse	Ribonucleasa
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Retrotranscripción
s	Segundo
SBE	Enzima ramificante del almidón
SDE	Enzima desramificante del almidón
SDS	Sodio Dodecil Sulfato
SS	Almidón sintasa
SSC	Tampón citrato sódico salino
SSS	Almidón sintasa soluble
SUS	Sacarosa sintasa
Taq polimerasa	Polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tampón de electroforesis Tris-borato/EDTA
TBS	Tampón Tris-NaCl
TCA	Ácido tricloroacético
TCEP	Tris (2-Carboxyethyl) phosphine
TDP	Timidín-5'-difosfato
TE	Tampón Tris-borato/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetra-metil-etile-diamida
TGM	Tampón Tris-Glicina-Metanol
Tris	Tris-(hidroximetil) aminometano
Tritón X-100	t-Octilfenoxipoli-etilensorbitano
Trx	Tiorredoxina
Tween-20	Monolaurato de polioxietilensorbitano
Ubi	Poliubiquitina de <i>O. sativa</i>
UDP	Uridín-5'-difosfato
UDPG	UDP-glucosa
UGPasa	UDP-glucosa pirofosforilasa
UTR	<i>Untranslated region</i>
UV	Ultravioleta

V	Voltio
v/v	Relación volumen/volumen
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido
λ	Longitud de onda
°C	Grados centígrados

BASES NITROGENADAS

A	Adenina
C	Citosina
G	Guanina
T	Timina

AMINOÁCIDOS

A	Ala	Alanina	L	Leu	Leucina
R	Arg	Arginina	K	Lys	Lisina
N	Asn	Asparagina	M	Met	Metionina
D	Asp	Ácido Aspártico	F	Phe	Fenilalanina
C	Cys	Cisteína	P	Pro	Prolina
E	Glu	Ácido Glutámico	S	Ser	Serina
Q	Gln	Glutamina	T	Thr	Treonina
G	Gly	Glicina	W	Trp	Triptófano
H	His	Histidina	Y	Tyr	Tirosina
I	Ile	Isoleucina	V	Val	Valina

I. INTRODUCCIÓN

I.1. LOS CEREALES

Los cereales representan el grupo más importante de plantas cultivadas y entre ellos se encuentran el trigo y el arroz, que suponen la base de alimentación de la mayor parte de la humanidad. Históricamente se han asociado con el origen de la civilización y la cultura de los pueblos, ya que el hombre pudo pasar de nómada a sedentario cuando se hizo agricultor. Desde entonces el cultivo de los cereales ha supuesto una parte importante de su sustento, siendo la naturaleza y el valor nutritivo de sus semillas el motivo de su cultivo. Del conjunto de cereales cultivados actualmente son el trigo y el arroz, junto con el maíz, los que presentan una mayor importancia económica siendo, con diferencia, los cereales más extendidos mundialmente en términos de superficie cultivada y con mayor producción a nivel mundial, cuya suma supuso el 89% de la producción total de cereales en 2010 (FAO: <http://faostat.fao.org>) (Tabla I.1).

Tabla I.1. Producción mundial de cereales

	Superficie cultivada (10 ⁶ Ha)	Rendimiento (Kg/Ha)	Producción (10 ⁶ t)
Maíz	161,7	5194,6	840,3
Arroz	159,4	4368,1	696,3
Trigo	217,2	3009,2	653,6
Cebada	47,6	2595,8	123,5
Sorgo	40,9	1361,2	55,7
Mijo	34,8	907,8	31,6
Avena	9,1	2161,9	19,6
Triticale	3,9	3385,6	13,3
Centeno	5,3	2319,4	12,4
Conjunto de cereales	688,1	3571,4	2457,7

Datos obtenidos de la división de estadística de la FAO, FAOSTAT (2010).

La base de la importancia económica que representan los cereales reside en el alto contenido de almidón que acumulan en sus semillas, donde puede llegar a suponer un 70% de su peso seco (Hannah and James, 2008). El almidón acumulado sirve a la planta para asegurar la progenie al constituir una reserva energética para la germinación de la semilla. El almidón procedente de las semillas de cereales suministra la principal fuente de hidratos de carbono para la alimentación humana y ganadera, además de tener importantes aplicaciones industriales, como la fabricación de colas y pegamentos, emulsionantes o papel, siendo incluso utilizado en las industrias farmacéutica y textil (James et al., 2003). En la actualidad, el uso de

almidón como materia prima para la producción de biopolímeros y bioalcoholes despierta un enorme interés frente a la creciente preocupación ante la dependencia de nuestra sociedad de las fuentes de energía no renovables, ofreciendo con ello una posible alternativa energética (Gray et al., 2006).

Los cereales son además una importante fuente de nitrógeno, que se acumula en forma de proteínas de almacenamiento de semillas, incrementando con ello su valor económico y nutricional. Gran parte de la importancia del trigo, por ejemplo, se debe de hecho a su composición proteica rica en gluten que le aporta a la semilla las propiedades necesarias para la fabricación del pan (Shewry and Halford, 2002).

I.1.1. Estructura y composición química de las semillas de cereales

Los cereales son un grupo de plantas pertenecientes en su mayoría a la familia de las Gramíneas. Son plantas herbáceas anuales cuyo fruto, comúnmente denominado grano y en términos botánicos cariósipide, consta principalmente de un embrión situado en un extremo y un endospermo que contiene la reserva energética para la germinación. Éste se encuentra rodeado por una envoltura externa denominada pericarpo que se desarrolla a partir de la pared del ovario. Bajo el pericarpo se encuentra la testa y el tejido nucelar, que derivan también de la pared interna del ovario. La testa es permeable al agua pero no a las sales disueltas, siendo de gran importancia para la germinación. La cuarta capa, denominada aleurona, se origina a partir de la diferenciación de células del endospermo y juega un papel muy importante en la germinación de la semilla. Pericarpo, testa, tejido nucelar y aleurona constituyen el salvado de las semillas de cereales, que comprende alrededor del 15% del peso del grano y posee importantes propiedades nutricionales y farmacéuticas (Hosahalli and Esmaeil, 2003).

La composición química del grano de los cereales es bastante uniforme, salvo excepciones como, por ejemplo, el elevado contenido en lípidos y el bajo contenido en almidón de la avena. Por lo general los cereales contienen entre un 58% y 72 % de hidratos de carbono, entre el 8% y el 13% de proteínas, una pequeña proporción de lípidos que varía entre el 2% y el 5%, alrededor de 2% de sales minerales y entre un 2% y 11% de fibras (Belitz and Grosch, 1982). A nivel de grano, la composición química no es uniforme y varía enormemente dependiendo del tejido y de la función que lleva a cabo dentro de la semilla (Fincher, 1989).

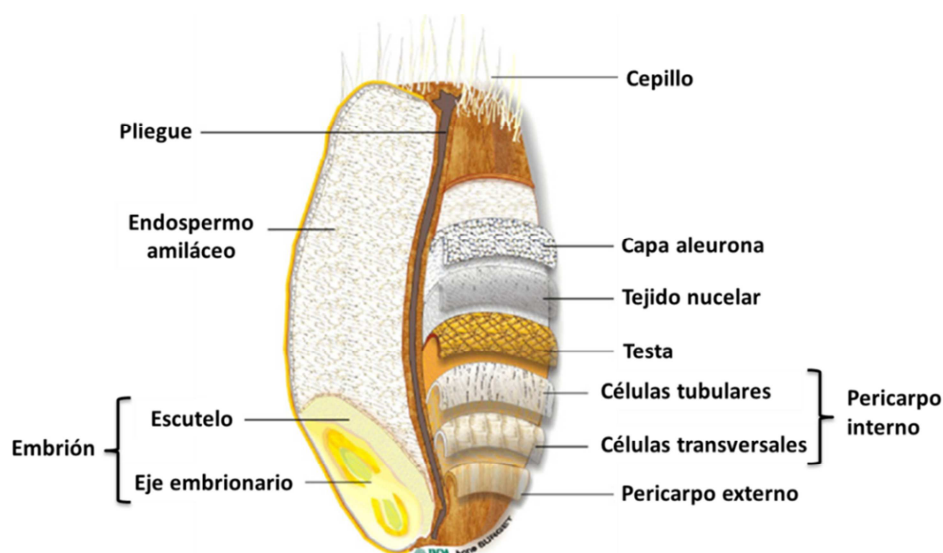


Figura I.1. Composición histológica de un grano de trigo. Adaptado de (Surget and Barron, 2005)

A continuación se detallan las diferentes partes de la semilla (Figura I.1) así como su composición química específica:

Pericarpo, es la capa más externa del grano y tiene función de protección de embrión y endospermo. Se trata de un tejido desarrollado a partir de las paredes del ovario, fotosintéticamente activo en las etapas iniciales del desarrollo del grano y constituido por células de paredes celulares robustas cuyo contenido celular va desapareciendo con la maduración del grano. Esta capa se divide a su vez en dos: una externa denominada epicarpio, exocarpo o pericarpo externo, y otra interior o pericarpo interno formada a su vez por el mesocarpo, constituido por células transversales, y el endocarpo, constituido por células tubulares (Figura I.2). El pericarpo es un tejido rico en fibras insolubles. En el grano de trigo maduro, por ejemplo, se compone principalmente de fibras de celulosa y xilanos, además de cantidades importantes de lignina, ácido ferúlico y compuestos bioactivos (betaina y colina) (Javed et al., 2012).

Testa, es un tejido de origen materno derivado de la pared interna del ovario, constituido por células cuyo contenido va desapareciendo con la maduración del grano. En el grano maduro supone una fina capa constituida por paredes celulares ricas en lignina y xilanos (Hemery et al., 2007)(Figura I.2). En algunos cereales como el trigo, la cebada y el centeno esta capa presenta un alto contenido de alquilresorcinoles (Landberg et al., 2008).

Tejido nucelar, es un tejido de origen materno constituido por células parenquimáticas y epidérmicas que degeneran en etapas tempranas del desarrollo de la semilla (Domínguez and Cejudo, 1998) (Figura I.2). Este tejido participa en la nutrición del endospermo en sus etapas iniciales de crecimiento, adquiriendo de este modo un papel importante en su desarrollo y crecimiento (Thorne, 1985).

Capa de aleurona, es una capa de células altamente especializadas que rodea al endospermo, a partir del cual se origina mediante diferenciación de sus células más periféricas. Sin embargo, las propiedades morfológicas y bioquímicas de las células de la capa de aleurona son diferentes de las del endospermo. En la mayoría de cereales se compone de una única capa de células aunque en algunos, como la cebada, consta de tres capas o de un número variable de capas en el caso del arroz. Las células de aleurona, que permanecen vivas durante todo el desarrollo de la semilla, poseen gruesas paredes de doble capa que definen una forma cuboide regular y encierran un contenido celular rico en proteínas y lípidos (Figura I.2). Estas células no poseen almidón. El citoplasma presenta un aspecto granular debido a la acumulación de cuerpos de inclusión vacuolares denominados gránulos de aleurona donde se acumulan altos niveles de proteínas (46%) y ácido fítico (40%), que constituye el principal componente de reserva de fósforo en el grano y su acción quelante de minerales provoca una acumulación importante de estos en los gránulos en forma de sales insolubles (Becraft and Yi, 2011; Regvar et al., 2011). Además poseen un alto contenido en vitaminas, en el trigo la mayoría de las vitaminas B están presentes en esta capa. La capa de aleurona juega un papel muy importante en las semillas de cereales sintetizando y secretando enzimas hidrolíticas hacia el endospermo para facilitar la movilización de las sustancias de reserva durante la germinación. Constituye además el punto de producción de metabolitos anti-microbianos que protege al grano contra patógenos capaces de penetrar el pericarpo.

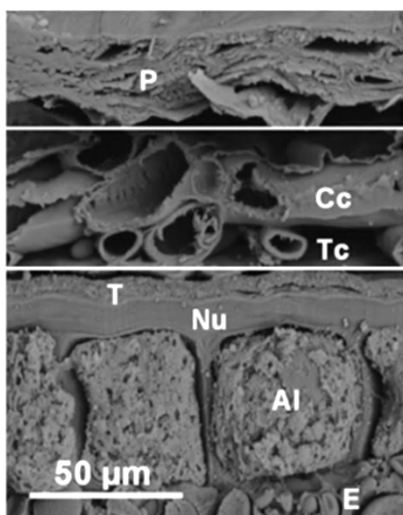


Figura I.2. Micrografía electrónica de barrido de una sección transversal del salvado de un grano de trigo que muestra las capas de tejido que lo componen

Pericarpo externo (P), Células transversales (Cc), Células tubulares (Tc), Testa (T), Tejido nucelar (Nu), Aleurona (Al), Endospermo (E). (Jerkovic et al., 2010).

Endospermo de reserva, constituye la mayor parte del volumen del grano y está formado por células muertas en el grano maduro. En el endospermo se almacenan los nutrientes que son movilizados durante la germinación para mantener el crecimiento de la nueva plántula hasta que ésta sea autótrofa. El principal compuesto de reserva es el almidón,

formado por polímeros de amilosa y amilopectina organizados en estructuras altamente ordenadas denominadas gránulos (James et al., 2003). En las células del endospermo, los gránulos de almidón están embebidos en una matriz de proteínas de reserva (Figura I.3). Las principales proteínas de reserva en cereales son prolaminas (altamente hidrofóbicas y solubles en soluciones alcohólicas) y globulinas (solubles en soluciones salinas), aunque también acumulan otras proteínas minoritarias. Ambas, prolaminas y globulinas, forman cuerpos proteicos en el lumen del retículo endoplasmático rugoso. En trigo y otros cereales relacionados, estos cuerpos son dirigidos hacia grandes vacuolas de almacenamiento de proteínas. En maíz y otros cereales como el arroz, estos cuerpos proteicos quedan retenidos dentro del retículo endoplasmático rugoso (Sabelli and Larkins, 2009).

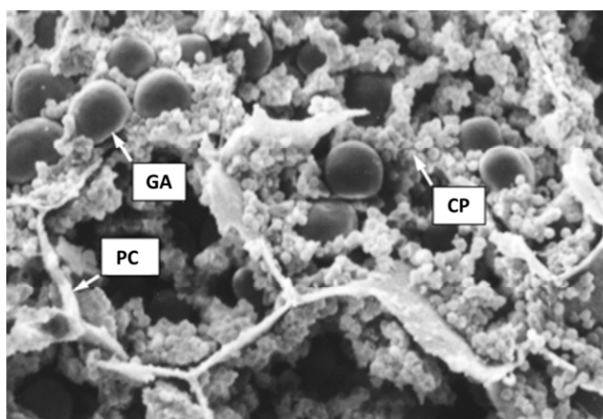


Figura I.3. Micrografía electrónica de barrido de endospermo de maíz en desarrollo que muestra las paredes celulares (PC), los gránulos de almidón (GA) y los cuerpos proteicos (CP). Adaptado de (Sabelli and Larkins, 2009)

Embrión, se localiza en un extremo del grano e incluye a su cotiledón laminar, altamente modificado, denominado escutelo. El embrión consta de un eje embrionario, donde se inserta el cotiledón que está cubierto por el coleoptilo y una radícula envuelta por la coleoriza.

Escutelo, este tejido altamente especializado se localiza entre el endospermo de reserva y el embrión. Dentro de este tejido se distingue un epitelio secretor que participa tanto en la secreción de enzimas hidrolíticas como en la absorción de productos de degradación procedentes del endospermo y su transporte hasta el embrión. Las características estructurales de las células de este epitelio se asemejan a las de las células de aleurona, conteniendo cuerpos proteicos especializados rodeados por cuerpos lipídicos que contienen fitina. Además poseen un contenido elevado de azúcares solubles y vitaminas. De este modo las células del epitelio del escutelo pueden iniciar rápidamente, al igual que las células de la capa de aleurona, la biosíntesis de proteínas al inicio de la germinación.

I.1.2. Ciclo de vida

El ciclo de vida de la semilla comprende dos fases bien definidas: desarrollo y germinación, separadas por un periodo de dormición (Rock and Quatrano, 1995). El desarrollo de la semilla se inicia con la fertilización, a la que le sucede un periodo de crecimiento donde la semilla alcanza su máximo tamaño. Culmina en la etapa de maduración, un proceso de pérdida masiva de agua que da lugar a la semilla madura, que entra en un periodo de dormición (Bewley, 1997). La fase de germinación se inicia tras la rehidratación de la semilla bajo condiciones ambientales apropiadas.

I.1.2.1. Desarrollo

El desarrollo del grano se inicia tras la fertilización, que en cereales comprende un doble evento. Un primer proceso de fertilización de dos núcleos polares del saco embrionario por una célula espermática produce un cigoto triploide que dará lugar al endospermo, mientras que la fertilización del óvulo por una segunda célula espermática produce un cigoto diploide, que mediante la embriogénesis dará lugar al embrión (Sabelli and Larkins, 2009). La importancia nutricional y económica de los cereales reside principalmente en las sustancias de reserva almacenadas en el endospermo. Es por ello que el desarrollo de este tejido haya sido objeto de numerosos estudios. En el desarrollo del endospermo en cereales se pueden distinguir cuatro etapas (Bosnes et al., 1992) (Figura I.4):

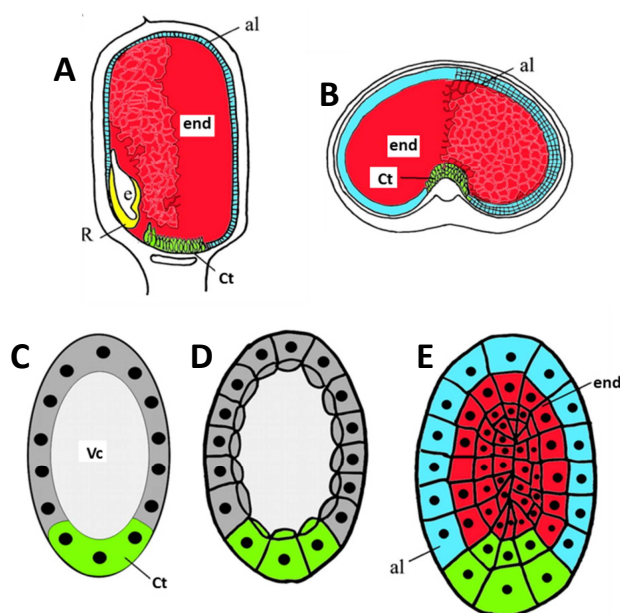


Figura I.4. Fases del desarrollo del endospermo de cereales

Tipos celulares del endospermo de maíz (A) y de cebada (B): endospermo de reserva (end), aleurona (al), células de transferencia (Ct) y células que rodean el embrión (e). De (C) a (E), esquematización de las fases de formación del sincitio (C), celularización (D) y diferenciación (E) del desarrollo del endospermo de cereales. El código de colores es el mismo que en (A) y (B). Vacuola centra (Vc). Adaptado de (Olsen, 2004).

- **Formación del sincitio.** Varias horas después de la fertilización el núcleo triploide inicial sufre ciclos sincronizados de división celular sin citocinesis ni formación de pared celular que resulta en la formación de un sincitio multinucleado. Una vez alcanzado el número de núcleos adecuado, que varía según la especie, éstos migran alrededor de una gran vacuola central siguiendo un patrón de polaridad antero-posterior. Este desarrollo sincitial se considera una estrategia evolutiva que permite una rápida proliferación celular facilitando el crecimiento de este tejido, cuya función es nutrir el crecimiento del embrión, especialmente durante el periodo en el que las células específicas dedicadas a la absorción de nutrientes por el endospermo aún no se han diferenciado.

- **Celularización.** El sincitio sufre un proceso de celularización mediante la formación de un sistema radial internuclear de microtúbulos y un proceso de formación de alveolos abiertos, esto es, estructuras tubulares abiertas por la pérdida de una pared celular periclinal interna que rodea cada núcleo. La celularización del endospermo ocurre centrípetamente desde la periferia hasta que la cavidad central está totalmente ocupada por células.

- **Diferenciación.** Incluye la formación de los principales tipos celulares (células de transferencia, aleurona, endospermo de reserva y células que rodean al embrión), el periodo de mitosis y endoreduplicación, y la acumulación de compuestos de reserva.

- **Maduración.** Es el proceso final del desarrollo del endospermo que consiste en una pérdida masiva de agua. Esta etapa comienza una vez que el grano ha alcanzado su máximo volumen y todos los tejidos están diferenciados y culmina con la generación de la semilla madura, que posee un contenido hídrico inferior al 10%. De este modo se incrementa la longevidad de las semillas así como su capacidad de resistencia ante condiciones ambientales adversas. La desecación de las semillas es un proceso mediado por la hormona ABA, que participa tanto en la regulación de genes codificantes de proteínas que intervienen en la protección frente a la desecación como en el establecimiento y mantenimiento de la semilla en el periodo de dormición (Bewley, 1997).

Aunque el desarrollo de la semilla requiere una alta tasa de división celular que permita el crecimiento y formación de nuevos tejidos, la muerte celular también es un proceso de gran importancia durante esta fase. Diferentes tejidos como son los de origen materno (pericarpo, testa y tejido nucelar) o el endospermo sufren procesos de muerte celular programada. La semilla madura se compone por tanto de diferentes tejidos que han sufrido muerte celular y por tejidos que permanecen vivos (embrión, escutelo y células de aleurona), en un estado latente, preparados para reactivarse metabólicamente durante la germinación (Pulido et al., 2009).

I.1.2.2. Germinación

La germinación es un proceso que comienza cuando el grano maduro entra en contacto con el agua y bajo condiciones ambientales adecuadas, provocando la activación del metabolismo. Durante este proceso se produce una elongación de los ejes embrionarios de la semilla que conducen a la emergencia de la nueva plántula. Es un proceso altamente regulado por hormonas, caracterizado por un decremento de los niveles de ABA y un incremento de la biosíntesis de giberelinas (GAs), que han sido descritas como reguladoras internas implicadas en la inducción de la germinación (El-Maarouf-Bouteau and Bailly, 2008). Las GAs difunden desde el embrión hacia el endospermo donde son detectadas por las células de aleurona, que responden a la hormona induciendo la expresión de genes de enzimas hidrolíticas entre las que se encuentran α -amilasas, glucanasas y proteasas (Fincher, 1989) (Figura I.5). Las enzimas hidrolíticas sintetizadas por las células de aleurona son secretadas al endospermo para provocar la movilización de los compuestos de reserva que serán absorbidos por el escutelo para nutrir el crecimiento de la nueva plántula. Una vez finalizada la movilización de los compuestos de reserva, las GAs activan la muerte de las células de aleurona (Fath et al., 2002).

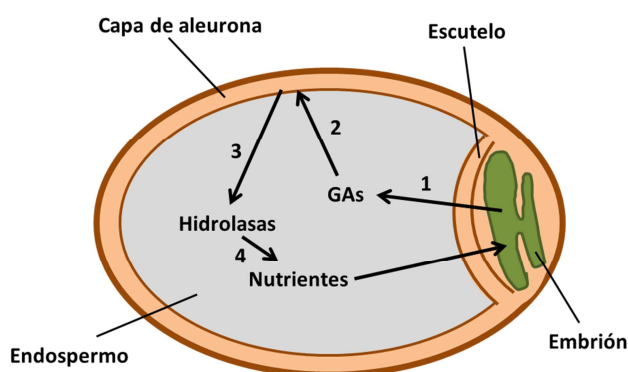


Figura I.5. Esquema de los procesos asociados a la germinación de las semillas de cereales

1, liberación de giberelinas por el embrión; 2, estimulación de la síntesis de hidrolasas en la capa de aleurona; 3, secreción de hidrolasas al endospermo; 4, degradación de las reservas; 5, transporte de nutrientes desde el endospermo al embrión.

Durante la germinación tiene lugar una acidificación del endospermo (Dominguez y Cejudo, 1999), necesaria por diferentes motivos: las proteasas que participan en la movilización de proteínas de reserva presentan una actividad óptima a pH ácido (Jacobsen and Varner, 1967; Mikola and Mikola, 1980), la solubilización de los compuestos de reserva del endospermo está favorecida también a pH ácido al facilitar la disociación de inhibidores endógenos de sus respectivas hidrolasas (Halayko et al., 1986; Hamabata et al., 1988), el transporte de los azúcares, péptidos y aminoácidos producidos por las hidrolasas hacia el escutelo requiere también un pH ácido (Sopanen et al., 1980; Salmenkallio and Sopanen, 1989; Hardy and Payne, 1991).

I.1.3. Estrés oxidativo durante el desarrollo y germinación de las semillas de cereales

Las especies reactivas del oxígeno o ROS (acrónimo del inglés *Reactive Oxygen Species*) derivan de procesos de reducción parcial del oxígeno que dan lugar al anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo (OH^\cdot) y oxígeno singlete (1O_2) (Apel and Hirt, 2004). El anión superóxido y el oxígeno singlete son altamente reactivos pero presentan una baja tasa de difusión por lo que interactúan mayoritariamente con moléculas en el sitio donde se generaron. El peróxido de hidrógeno por el contrario tiene una menor reactividad pero posee una gran capacidad de difusión a través de las membranas biológicas. Sin embargo, el peróxido de hidrógeno puede convertirse espontáneamente en radicales hidroxilo, enormemente reactivos.

Aunque las ROS se producen como consecuencia del metabolismo aeróbico, su acumulación tiene efectos tóxicos para la célula debido a que la reactividad de estas especies provoca daños en lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Para controlar los niveles internos de ROS las células han desarrollado sistemas antioxidantes que incluyen sistemas enzimáticos como catalasas, peroxidasas o superóxido dismutasas, y diferentes moléculas con capacidad antioxidante como el ascorbato, glutatión y polifenoles, que permiten el mantenimiento de niveles de ROS relativamente bajos en condiciones estándar de crecimiento (Foyer and Noctor, 2009). Sin embargo, diferentes estreses ambientales como la salinidad, sequía, alta intensidad lumínica, bajas y altas temperaturas o el ataque de patógenos alteran la homeostasis e incrementan la producción de ROS causando estrés oxidativo (Mittler et al., 2004). Además de su efecto tóxico, las ROS también tienen una importante función señalizadora. Ejemplos de esta función señalizadora están bien documentados en el caso del peróxido de hidrógeno, habiéndose demostrado su participación en diferentes procesos como la muerte celular programada (Delledonne et al., 1998), el gravitropismo de la raíz (Joo et al., 2001) o el cierre estomático mediado por ABA (Pei et al., 2000). Los sistemas antioxidantes además de proteger a la célula de daño oxidativo, deben ser capaces de equilibrar los niveles de producción y retirada de las ROS para permitir la función señalizadora de estas especies (Mittler et al., 2004).

Las ROS son componentes clave en diferentes eventos de la vida de la semilla. Durante el desarrollo de la semilla, la actividad fotosintética es una fuente importante de ROS aunque solo en etapas muy tempranas donde los cloroplastos son funcionales. La respiración mitocondrial es probablemente una de las principales fuentes de ROS pero su actividad decrece considerablemente con la maduración, una fase con muy baja actividad metabólica

(Bailly, 2004). En esta fase, sin embargo, la semilla sufre estrés oxidativo debido a la pérdida masiva de agua (Leprince et al., 1993; Leprince et al., 1994). Finalmente, la germinación de la semilla, una fase de reactivación metabólica que implica la reanudación de la respiración, está asociada con una elevada producción de ROS en el embrión y escutelo (Caliskan and Cuming, 1998; Hite et al., 1999).

En semillas, la producción de ROS se ha asociado normalmente con procesos perjudiciales, como el envejecimiento de la semilla madura causado por la peroxidación de lípidos, proceso que reduce la vida útil de la semilla para su uso alimenticio (McDonald et al., 1999). Sin embargo, cada vez son más numerosos los estudios que muestran los beneficios que la acumulación de ROS aporta en la germinación de la semilla y el crecimiento de la nueva plántula, actuando como moléculas señalizadoras (Figura I.6). El peróxido de hidrógeno estaría implicado, por ejemplo, en la salida del estado de dormición de la semilla. La aplicación exógena de peróxido de hidrógeno promueve la germinación de la semilla en diferentes cereales. También se ha demostrado su implicación, a nivel de regulación de la expresión de genes, en la señalización mediada por ABA, hormona implicada en el mantenimiento de la dormición. En semillas germinadas, las ROS, en particular el peróxido de hidrógeno, estarían implicadas en diferentes procesos como la movilización de compuestos de reserva mediante la carbonilación de proteínas, un proceso de oxidación irreversible que incrementa la susceptibilidad de las proteínas de reserva a la rotura proteolítica; o en la protección frente a patógenos, bien por su efecto tóxico para los microorganismos o disparando la reacción de hipersensibilidad y muerte celular programada en las células atacadas por los patógenos (El-Maarouf-Bouteau and Bailly, 2008).

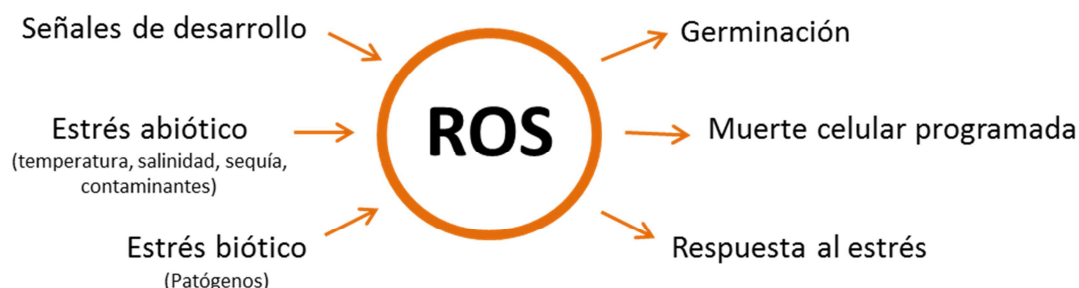


Figura I.6. Función señalizadora de ROS en semillas de cereales

Diferentes estímulos internos (señales de desarrollo) y externos (estrés abiótico o biótico) pueden producir un incremento en la producción de ROS, que actúan como moléculas señalizadoras capaces de promover diferentes procesos en respuesta a dichos estímulos (germinación, muerte celular programada o respuestas al estrés).

I.1.4. Regulación redox en semillas de cereales

El estrés oxidativo así como otros estreses bióticos y abióticos provocan alteraciones en el estado redox celular. Con el objetivo de evitar daños celulares las plantas han desarrollado un complejo sistema de regulación redox, que implica a múltiples componentes interconectados que actúan a distintos niveles, desde la transcripción y traducción, hasta la modulación de la actividad enzimática a través de modificaciones post-traduccionales de intercambio tiol-disulfuro de cisteínas (Oelze et al., 2008).

Las modificaciones post-traduccionales constituyen una de las principales vías de regulación redox. Se basan en la reducción reversible de los puentes disulfuro establecidos entre residuos de cisteína de las proteínas porque, a través de estos cambios, se modula la actividad de las mismas. Originalmente, la regulación de las proteínas mediante cambios en el estado redox de los residuos de cisteínas se describió en procesos asociados a la fotosíntesis, sin embargo actualmente está establecido como un mecanismo regulador de numerosos procesos entre los que se incluye la germinación de semillas (Montrichard et al., 2009).

Los grupos tiólicos de los residuos de cisteína de las proteínas pueden sufrir diferentes estados de oxidación. Desde el grupo sulfidrilo (-SH) el azufre se puede oxidar a disulfuro (S-S) o ácido sulfénico (R-SOH), sulfínico (R-SO₂H) o sulfónico (R-SO₃H) (Jacob et al., 2006). Como los grupos sulfidrilos son muy susceptibles a la oxidación, en condiciones fisiológicas, aunque el potencial redox del citoplasma favorecería la reducción de los residuos de cisteína a sulfidrilos, suelen encontrarse oxidados en forma de puentes disulfuro debido a los bajos niveles de ROS existentes en dichas condiciones. La formación de puentes disulfuro, ya sean intra- o intermoleculares, protege a las Cys de sobreoxidación. Además de oxidarse a disulfuro, las cisteínas también pueden oxidarse a ácido sulfénico, aunque es una conformación menos estable. No obstante ambas oxidaciones son reversibles y pueden volver al estado reducido (-SH) fácilmente. Bajo condiciones altamente oxidantes, los grupos tioles pueden oxidarse a ácido sulfínico o sulfónico. Estas modificaciones, sin embargo, son irreversibles (Montrichard et al., 2009). Los cambios en el estado de oxidación de los residuos de cisteína suelen provocar una alteración en la estructura de las proteínas a la que le acompaña una pérdida o ganancia de función, un incremento en la susceptibilidad a proteasas o la desnaturalización. De este modo, los cambios en el estado redox de las proteínas mediante la formación reversible de puentes disulfuro constituyen un mecanismo de regulación de su actividad. El mantenimiento de este sistema de regulación tiol-disulfuro está principalmente mediado por tiorredoxinas (Trx) y glutarredoxinas (Grx), pequeñas proteínas con actividad disulfuro reductasa que desempeñan un papel clave en la regulación y señalización redox (Michelet et al., 2006).

I.1.5. Sistema NTR/Tiorredoxina en semillas de cereales

Las Trxs son proteínas globulares de bajo peso molecular, 12-14 kDa, con un sitio activo conservado constituido por la secuencia consenso CGPC, en la que los dos residuos de cisteína catalizan reacciones de oxidorreducción (Schurmann and Jacquot, 2000). Las Trxs de plantas están codificadas por una compleja familia de al menos 25 miembros (Meyer et al., 2005). Se clasifican en diferentes tipos dependiendo de sus características y de su localización celular: Trx *o*, mitocondrial; Trx *f*, Trx *m*, Trx *x*, Trx *y* y Trx *z* cloroplásticas; y Trx *h* presente en los tejidos heterotróficos y de localización citosólica, mitocondrial o nuclear. Recientemente se ha descrito un nuevo tipo, Trx *s*, que parece ser exclusivo de leguminosas (Montrichard et al., 2009). Las Trx *h* son muy abundantes en semillas, donde participan en la regulación redox de la movilización de sustancias de reserva facilitando por tanto su germinación (Kobrehel et al., 1992; Besse et al., 1996).

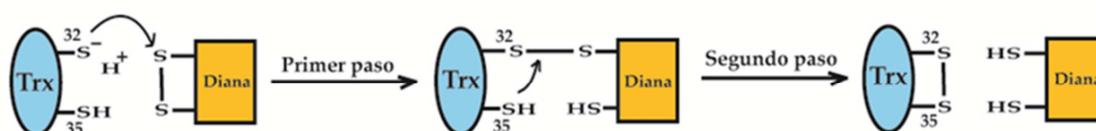


Figura I.7. Mecanismo de acción de las tiorredoxinas

En el primer paso el tiol de la Cys más cercana al extremo N-terminal realiza un ataque nucleofílico sobre el puente disulfuro de la proteína diana. Se genera un complejo intermedio muy inestable, que se disocia por el ataque de la segunda Cys, liberándose la Trx oxidada y la diana en estado reducido.

El mecanismo de acción de las Trxs comienza con el ataque nucleofílico del grupo tiólico de uno de los residuos de cisteína del sitio activo sobre el puente disulfuro de la proteína diana, reduciéndolo y formándose un complejo intermedio muy inestable entre ambas. En el segundo paso, el segundo residuo de cisteína ataca el enlace disulfuro intermediario obteniéndose la proteína diana reducida y la Trx oxidada (Figura I.7). La Trx oxidada necesita ser reducida para realizar nuevos ciclos catalíticos. Mientras que las Trxs plastidiales obtienen el poder reductor de la ferredoxina (Fd) reducida en una reacción catalizada por la ferredoxina tiorredoxina reductasa (FTR) (Schurmann and Jacquot, 2000), las formas citosólicas, mitocondriales y nucleares obtienen el poder reductor del NADPH en una reacción catalizada por una tiorredoxina reductasa dependiente de NADPH (NTR) (Figura I.8). Estas son flavoproteínas pertenecientes a la familia de las piridín nucleótido oxidoreductasas que poseen FAD como cofactor, de manera que el poder reductor es transferido del NADPH al FAD, después al puente disulfuro del sitio activo y finalmente se produce la reducción del sitio activo de las Trx (Mustacich and Powis, 2000). A diferencia del gran número de genes que

codifican Trxs en plantas, las NTRs están codificadas por tres genes en *Arabidopsis* y arroz (Serrato et al., 2004). Los dos primeros codifican NTRA y NTRB, isoformas predominantes en el citosol y en la mitocondria, respectivamente, donde son el sistema Trx reductasa predominante (Jacquot et al., 1994; Laloi et al., 2001). El tercer gen codifica NTRC, una NTR que presenta como peculiaridad un dominio Trx en su extremo C-terminal. Tanto NTRA como NTRB son isoformas abundantes en semillas de cereales (Shahpiri et al., 2008), sin embargo, no se ha descrito hasta el momento la presencia de NTRC en semillas de cereales.

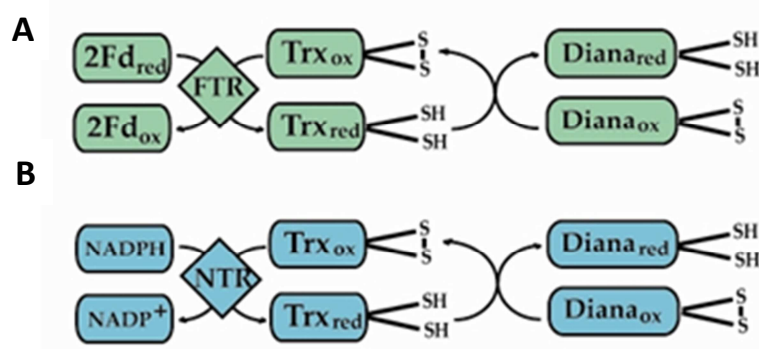


Figura I.8. Sistemas de tiorredoxinas

El sistema Fd/FTR/Trx se encuentra en el cloroplasto (A), mientras que el sistema NADPH/NTR/Trx clásicamente se ha descrito en el citosol y la mitocondria (B).

NTR y Trxs constituyen un sistema redox universal, encontrándose en todo tipo de organismos desde bacterias a plantas y animales. En cereales, el sistema NTR/Trx, y más concretamente el constituido por las Trxs tipo *h*, ha sido identificado en diferentes tejidos de las semillas, donde ejerce importantes funciones tanto en el desarrollo como en la germinación de las mismas:

- **Activación de la germinación facilitando la movilización de los compuestos de reserva en el endospermo.** En el inicio de la germinación, la mayor parte de las proteínas se encuentran en un estado oxidado como consecuencia del estrés oxidativo causado por la desecación de la semilla. El sistema NTR/Trx*h* participa en la activación de enzimas hidrolíticas implicadas en la movilización de compuestos de reserva del endospermo, como las tiol-proteasas (Dominguez and Cejudo, 1995) y otras proteínas dependientes de tiorredoxinas como las tiocalsinas (Besse et al., 1996), que son activas en estado reducido. Además, se ha demostrado la participación de la Trx *h* en la inactivación de los inhibidores de α -amilasas y tripsinas, permitiendo así la degradación del almidón y las proteínas de reserva (Kobrehel et al., 1991; Kobrehel et al., 1992). Diferentes estudios de identificación de proteínas diana de Trxs en endospermo de cereales confirman el importante papel que ejerce este sistema redox en la germinación de semillas de cereales (Montrichard et al., 2009).

- **Sistema de señalización redox.** Estudios de localización realizados en semillas de trigo en desarrollo revelaron la presencia de Trx *h* en tejidos vasculares y células de transferencia (Serrato and Cejudo, 2003). La localización en estos tejidos, implicados en la conexión de la semilla con las diferentes partes de la planta, sugieren la participación del sistema NTR/Trx *h* en la transmisión de señales redox. Por otro lado, estudios realizados con semillas transgénicas de cebada sobreexpresoras de Trx *h*, mostraron una aceleración de la germinación del embrión y un incremento en la liberación de α -amilasas por las células de aleurona, evidencias de la implicación de la Trx *h* en la comunicación entre ambos tejidos (Wong et al., 2002).

- **Protección frente al daño oxidativo en células de aleurona y escutelo durante el desarrollo y germinación de la semilla.** Las células de aleurona y escutelo necesitan sobrevivir al estrés oxidativo causado durante la desecación de la semilla. La identificación, mediante el análisis inmunocitoquímico en semillas de trigo, de la acumulación de NTR y Trx *h* en el núcleo de estas células junto con el descubrimiento de la capacidad de NTR para llevar a cabo la reducción del peróxido de hidrógeno a través de la 1-Cys-Prx (también con localización nuclear en estos tejidos), puso de manifiesto la participación de este sistema redox en la protección de las estructuras nucleares frente al daño oxidativo (Pulido et al., 2009).

- **Posible control de la expresión génica.** La participación del sistema NTR/Trx *h* en el control de los niveles de peróxido de hidrógeno en el núcleo de células de aleurona y escutelo, junto con la capacidad del peróxido de hidrógeno de ejercer una regulación redox sobre factores de transcripción (Delaunay et al., 2002), abre la posibilidad de que el control redox de la expresión génica sea una función adicional del sistema NTR/Trx *h* en semillas de cereales.

I.1.5.1. NTRC

NTRC es una NTR atípica compuesta por un módulo NTR y un módulo Trx en el mismo polipéptido, y que es capaz de conjugar ambas actividades para reducir directamente los puentes disulfuro de sus proteínas diana utilizando NADPH como donador de electrones (Serrato et al., 2004; Moon et al., 2006; Perez-Ruiz et al., 2006). Para llevar a cabo este proceso, NTRC actúa como homodímero, de tal forma que la transferencia del poder reductor se produce preferentemente entre el módulo NTR de una subunidad y el módulo Trx de la otra (Perez-Ruiz and Cejudo, 2009) (Figura I.9).

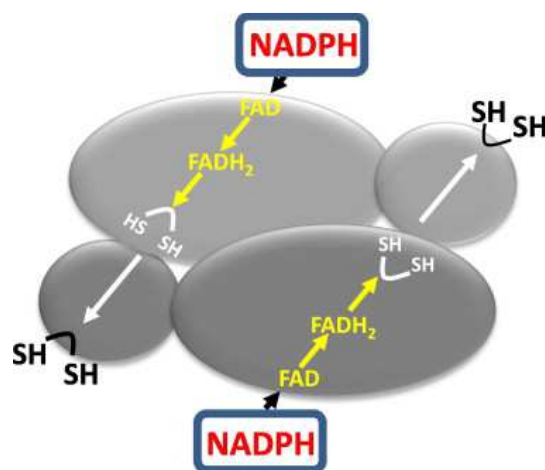


Figura I.9. Transferencia del poder reductor a través de NTRC

NTRC es activa en forma de homodímero. El NADPH dona los electrones al cofactor FAD del módulo NTR de cada subunidad y posteriormente los electrones son transferidos a los residuos de cisteína del sitio activo del dominio Trx de la otra subunidad. NTRC convierte el poder reductor (NADPH) en señal redox (tioles). (Cejudo et al., 2012)

NTRC está codificada por un gen de copia única exclusivo de organismos fotosintéticos encontrándose en plantas, algas y algunas, no todas, cianobacterias (Pascual et al., 2010). Inicialmente se describió como enzima cloroplástica, sin embargo, estudios recientes sobre el patrón de expresión del gen *NTRC* en *Arabidopsis* revelaron que se expresa tanto en tejidos fotosintéticos como no fotosintéticos y que la proteína se localiza en todo tipo de plastos (Kirchsteiger et al., 2012).

NTRC utiliza el NADPH como fuente de poder reductor, mostrando una alta afinidad por este donador de electrones (Serrato et al., 2004). En el cloroplasto, el NADPH se produce durante el día como producto final de la cadena transportadora de electrones fotosintética en una reacción catalizada por una Ferredoxina-NADP⁺ oxidoreductasa (FNR) (Ceccarelli et al., 2004; Lintala et al., 2007) y durante la noche por la oxidación de azúcares en las reacciones iniciales de la ruta oxidativa de las pentosas fosfato (Neuhaus and Emes, 2000). De este modo, NTRC en el cloroplasto actuaría como sistema redox complementario al sistema FTR/Trx durante el día, donde los niveles de Fd reducida son elevados; y como principal vía de regulación redox durante la noche, donde no existe producción fotosintética de Fd reducida (Perez-Ruiz et al., 2006). En los plastos de tejidos no fotosintéticos la única fuente de poder reductor es el NADPH generado en la ruta oxidativa de las pentosas fosfato de la sacarosa importada desde los tejidos fotosintéticos. En estos plastos, NTRC podría estar ejerciendo un importante papel en la regulación redox.

En el cloroplasto NTRC participa en la destoxificación de peróxidos actuando como principal reductor fisiológico de 2-Cys Prxs, y su función es especialmente importante durante la noche, cuando no existe ferredoxina reducida. De hecho, estudios *in vitro* demostraron que

NTRC es capaz de reducir con más eficiencia a la 2-Cys Prx que otras Trxs cloroplastídicas que eran consideradas hasta entonces como los reductores fisiológicos de esta peroxirredoxina (Moon et al., 2006; Perez-Ruiz et al., 2006; Alkhalfioui et al., 2007). Además, el sistema NTRC/2-Cys Prx, como sistema antioxidante, estimula la actividad ciclasa durante la síntesis de clorofila, que es sensible a ROS (Aarti et al., 2006; Stenbaek et al., 2008).

El mutante *ntrc* de *Arabidopsis*, *knock out* para la enzima, presenta una mayor sensibilidad a diferentes estreses abióticos y muestra rasgos fenotípicos característicos, como retraso en el crecimiento, hojas más pálidas debido a un menor contenido de clorofilas *a* y *b*, estructura anómala del mesófilo de la hoja, alteración en la estructura cloroplastídica y una menor tasa de fijación de CO₂, entre otras. Además, el fenotipo de este mutante es mucho más severo en condiciones de día corto (Perez-Ruiz et al., 2006; Lepisto et al., 2009). Sorprendentemente, las alteraciones fenotípicas observadas en este mutante son mayores que las presentadas por un mutante con niveles reducidos de 2-Cys Prx cloroplastídica (Pulido et al., 2010). Este hecho, junto con la existencia de diversos sistemas antioxidantes en el cloroplasto capaces de suplir su función (Foyer and Noctor, 2009), sugerían que NTRC debe ejercer otras funciones en el cloroplasto diferentes a la regulación redox de la 2-Cys Prx. Así mismo, el descubrimiento del patrón de localización de NTRC también en plastos no fotosintéticos (Kirchsteiger et al., 2012), reveló la posibilidad de la participación de la enzima en la regulación redox de procesos diferentes a la destoxificación de ROS característica de los plastos fotosintéticos. Para llegar a conocer las diferentes funciones que NTRC lleva a cabo tanto en plastos fotosintéticos como no fotosintéticos se requiere la identificación de sus proteínas dianas.

En los últimos tiempos se han realizado avances en el conocimiento de las nuevas funciones de NTRC (Figura I.10), demostrándose su participación en diferentes procesos como la síntesis de almidón mediante la regulación redox de la ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa), enzima clave de la ruta y altamente regulada, y cuyo efecto regulador ha sido descrito tanto en hoja como en raíz (Michalska et al., 2009). Otros procesos para los que se ha propuesto una regulación redox mediada por NTRC son la síntesis de aminoácidos aromáticos (Lepisto et al., 2009) o la biosíntesis de clorofila a través de la regulación redox de la Mg-quelatasa, enzima implicada en la inserción de Mg²⁺ en la protoporfirina IX (Stenbaek and Jensen, 2010). Sin embargo las características del efecto regulador de NTRC en estos procesos aún se desconocen.

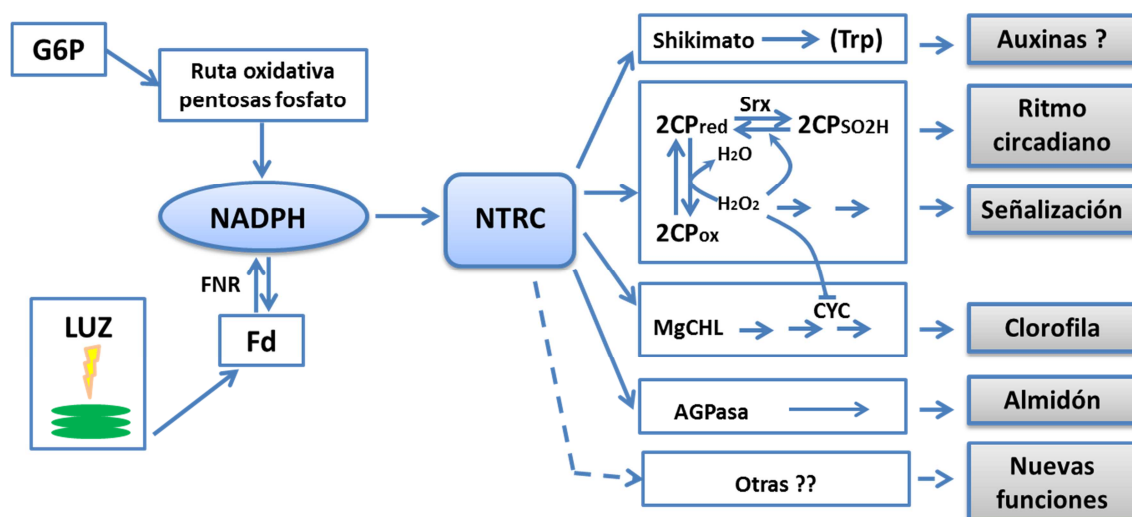


Figura I.10. Resumen de las funciones de NTRC en la regulación redox del cloroplasto

El poder reductor (NADPH) en el cloroplasto procede de la ferredoxina (Fd), reducida por la cadena transportadora de electrones, en una reacción catalizada por la Fd-NADP-oxidoreductasa (FNR); o de la glucosa 6-P (G6P) a través de la ruta oxidativa de las pentosas fosfato. NTRC participa en la regulación redox de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos como el triptófano (Trp), que es un precursor de la síntesis de auxinas. NTRC es el principal reductor de 2-Cys Prx (2CP) cuya actividad reduce el peróxido de hidrógeno y, por tanto, protege la ciclase Mg-protoporfirin monometil ester (CYC) proporcionando un efecto positivo en la biosíntesis de clorofila. Finalmente, NTRC participa en la regulación redox de la Mg-quelatasa (Mg-CHL) y de la ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa) participando así en la regulación de la biosíntesis de clorofilas y almidón, respectivamente. Es probable la posible participación de NTRC en la regulación de otras funciones a través de la regulación redox de nuevas proteínas diana en plastos. Adaptado de (Cejudo et al., 2012).

I.1.6. Metabolismo del almidón

Las semillas de cereales acumulan grandes cantidades de almidón, que constituye una reserva energética primordial para la germinación. Dada la enorme importancia agroeconómica del almidón procedente de cereales, anteriormente mencionada, el metabolismo del almidón y las enzimas participantes en el mismo han sido objeto de numerosos estudios por lo que su ruta biosintética y degradativa ha sido descrita en detalle.

El almidón es un polímero constituido por residuos de D-glucosa unidos mediante enlaces glucosídicos (α -1,4 y α -1,6). En las semillas de cereales se almacena almidón de reserva, que se sintetiza y acumula en los amiloplastos de las células del endospermo en forma de gránulos insolubles. El número, tamaño y forma de estos varían según la especie. La característica principal del almidón de reserva, que lo diferencia del almidón transitorio sintetizado en los cloroplastos de células fotosintéticas, es la existencia de una separación temporal entre los procesos de síntesis y de degradación, ocurriendo en fases distintas de su ciclo de vida como son el desarrollo y la germinación de la semilla, respectivamente. En el almidón transitorio en cambio, la síntesis y degradación ocurren de forma alterna y dinámica durante el ciclo día/noche.

En tejidos no fotosintéticos, como es el endospermo de semillas de cereales, la fuente de carbono para la síntesis del almidón procede de la sacarosa sintetizada en el tejido fotosintético e importada a los órganos sumidero a través del sistema vascular de la planta. El transporte desde las células fuente a las células sumidero se realiza mediante transportadores de sacarosa localizados en la membrana plasmática de estas células así como de las células transportadoras del floema (Lemoine, 2000). De este modo, la sacarosa se importa al citosol de las células del endospermo donde se transforma por la acción secuencial de las enzimas sacarosa sintasa (SUS, también denominada SuSy), UDP-glucosa pirofosforilasa (UGPasa) y fosfoglucomutasa citosólica (cPGM) en glucosa-6 fosfato (Glc-6-P). La Glc-6-P se importa al amiloplasto mediante un translocador de hexosas específico (Fischer and Weber, 2002) donde se convierte en glucosa-1 fosfato (Glc-1-P) que sirve como precursor de la síntesis de almidón (Neuhaus and Emes, 2000).

I.1.6.1. Síntesis de almidón en semillas de cereales

La síntesis de almidón en plantas vasculares es el resultado de una compleja ruta metabólica en la que se pueden distinguir cuatro pasos enzimáticos básicos: activación del sustrato, elongación, ramificación y desramificación del polímero (Ballicora et al., 2004). En semillas de cereales esta ruta posee además características específicas diferentes a la existente en tejidos fotosintéticos y en otros tejidos no fotosintéticos (Figura I.11).

- **Activación del sustrato**

En plantas, la forma activada de glucosa para la donación de grupos glucosilo al polímero en crecimiento es la ADP-glucosa (ADPG), sintetizada a partir de ATP y Glc-1-P en una reacción catalizada por la ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa, reacción 1).



Esta reacción es considerada como el paso limitante para la biosíntesis del almidón en plantas (Green and Hannah, 1998). La reacción sólo es reversible *in vitro* dado que la hidrólisis del pirofosfato (PPi) mediada por pirofosfatasas, garantiza la casi total irreversibilidad del proceso *in vivo*.

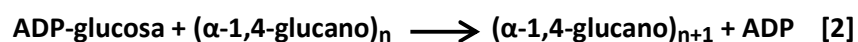
Al catalizar el primer paso de la ruta metabólica, la AGPasa es un punto clave de regulación de la biosíntesis de almidón y como tal está sujeta a un complejo mecanismo de regulación que actúa en diferentes niveles jerárquicos. Los principales mecanismos que controlan la actividad de la enzima son la regulación alostérica por intermediarios metabólicos de las vías principales de asimilación de carbono, activándose en presencia de 3-fosfoglicerato

(3-PGA) e inhibiéndose por fosfato inorgánico (Pi) (Preiss, 1988); el control redox postraduccional en respuesta a luz y azúcares mediado por Trxs (Ballicora et al., 2000; Hendriks et al., 2003) y en el que, como se mencionó anteriormente, está implicada NTRC (Michalska et al., 2009); y la regulación de la expresión de los genes que codifican AGPasa.

Una característica exclusiva del endospermo de cereales es la existencia de dos formas distintas de AGPasa, plastídica y citosólica (Figura I.11B). En este tejido la síntesis de ADPG ocurre mayoritariamente en el citosol (Denyer et al., 1996; Beckles et al., 2001) y se importa al amiloplasto a través de un translocador específico, cuya actividad es crucial para la síntesis de almidón en cereales (Shannon et al., 1998). Esta isoforma citosólica exclusiva de cereales presenta características propias como son la baja sensibilidad a la activación alostérica por 3-PGA y mayor dependencia de la disponibilidad de sustrato o la ausencia en la proteína del residuo de cisteína conservado implicado en la regulación redox de la enzima. De esta forma, los cereales aseguran una alta tasa de síntesis de almidón en el endospermo de las semillas al canalizar todo el metabolismo del carbono hacia la síntesis de almidón y disponer de un suministro de ADPG garantizado (Sikka et al., 2001; Hendriks et al., 2003).

- **Elongación del polímero**

Tras la síntesis de la ADPG, tiene lugar la transferencia del grupo glucosilo al extremo no reductor del polímero en crecimiento, mediante la formación de nuevos enlaces α -(1,4). Este paso está catalizado por las almidón sintasas (SS, reacción 2).



En plantas, las almidón sintasas pueden clasificarse en dos grandes grupos, solubles (SSS) y unidas a gránulo (GBSS). Las SSS están implicadas exclusivamente en la síntesis de amilopectina y se pueden diferenciar, mediante comparación de sus secuencias primarias, cuatro isoformas denominadas SSSI, SSSII, SSSIII y SSSIV (Ball and Morell, 2003; Hirose and Terao, 2004; Tetlow et al., 2004). La GBSS, implicadas en la síntesis de amilosa, presentan una única isoforma en plantas (GBSSI), excepto algunos cereales como el arroz, que poseen dos (GBSSI y GBSSII) (Tetlow et al., 2004).

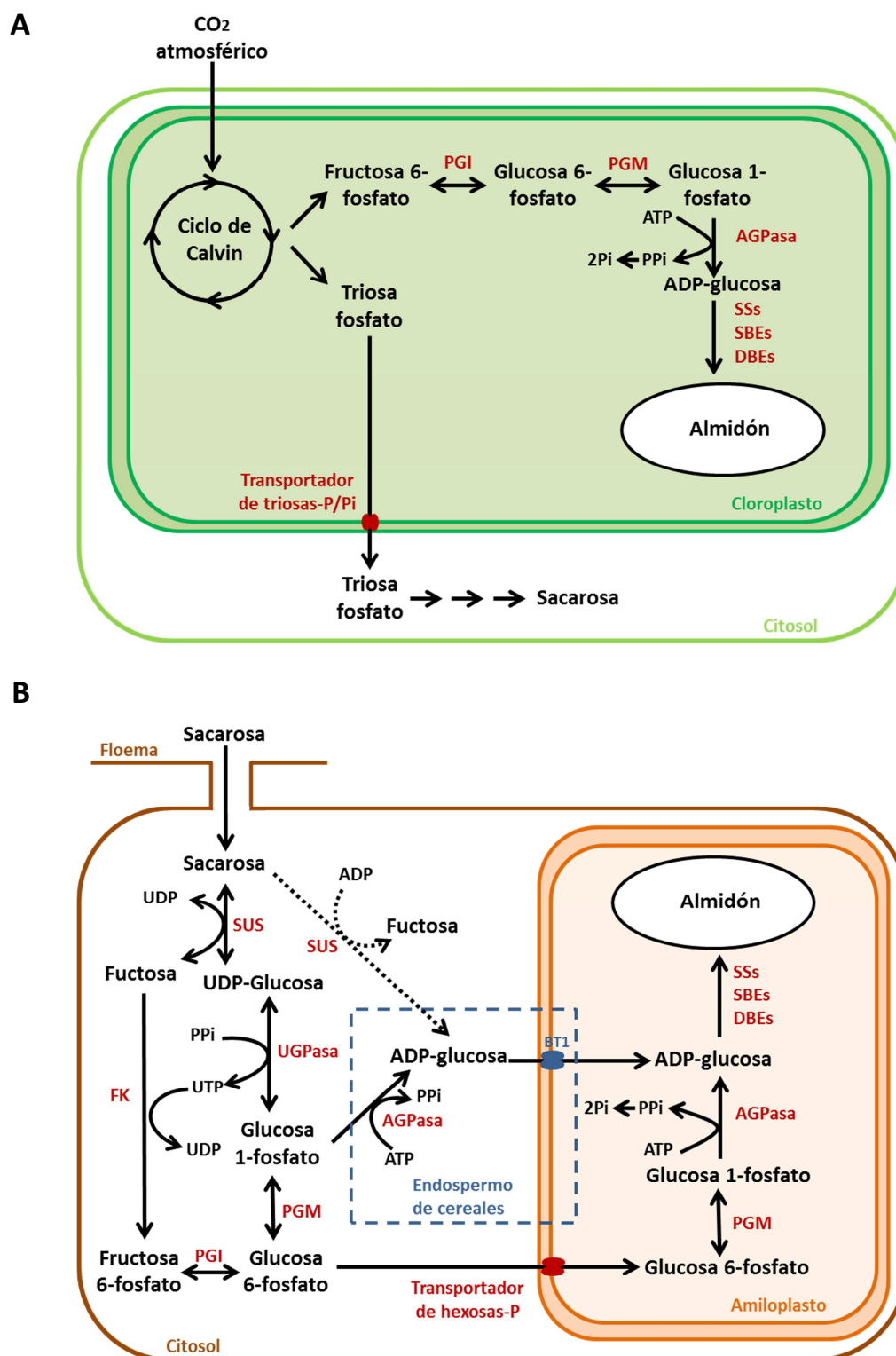
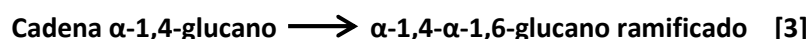


Figura I.11. Rutas de síntesis de almidón en células fotosintéticas (A) y en células heterotróficas (B)
PGI, fosfoglucoisomerasa; **P**GM, fosfoglucomutasa; **A**GPasa, ADP-glucosa pirofosforilasa; **S**US, sacarosa sintasa; **U**GPasa, UDP-glucosa pirofosforilasa; **B**T1, transportador de ADPG *Brittle1*; **S**Ss, **S**BEs y **D**BEs, almidón sintasas, enzimas ramificantes y enzimas desramificantes, respectivamente; **F**K, fructoquinasa. Las reacciones dentro del recuadro azul son exclusivas del endospermo de cereales. Las flechas punteadas indican una posible reacción catalizada por la SUS en células heterotróficas.

- **Ramificación del polímero**

Las enzimas ramificantes del almidón (SBE, reacción 3), al igual que las SS, participan en la síntesis de amilopectina. En concreto, son las responsables de catalizar la separación de un fragmento del extremo no reductor de la molécula de amilopectina, por rotura de una unión α -(1,4). El fragmento liberado es posteriormente unido, por la misma enzima, al C₆ de una molécula de glucosa mediante la formación de un nuevo enlace glucosídico α -(1,6), dando lugar a un punto de ramificación en la amilopectina.



En plantas se han descrito dos isoformas en base a las diferencias en su secuencia de aminoácidos, denominadas SBEI y SBEII (Ball and Morell, 2003; Tetlow et al., 2004).

- **Desramificación del polímero**

Aunque inicialmente se pensaba que las actividades SSs y SBEs eran las únicas requeridas para la síntesis de la amilopectina y la formación del gránulo, actualmente se sabe que algunas de las enzimas desramificantes (DBEs) son también necesarias para la correcta formación de éste (Zeeman et al., 1998; Tetlow et al., 2004). Las DBEs catalizan la hidrólisis de los enlaces α -(1,6) y según sus características enzimáticas y estructurales se clasifican en dos tipos, las denominadas DBE tipo isoamilasa y las DBE tipo pululanasa (Beatty et al., 1999).

El proceso de biosíntesis de almidón anteriormente descrito es el más aceptado por la comunidad científica, ya que lo soportan numerosos resultados experimentales (Smith et al., 1997; Sivak and Preiss, 1998; Ball and Morell, 2003; Tetlow et al., 2004). Sin embargo, no es el único modelo propuesto. Un modelo alternativo para la síntesis del almidón propone que la SUS catalizaría, en el citosol de las células vegetales, la síntesis *de novo* de la ADPG, que sería transportada al interior del plasto por medio de un translocador específico (Pozueta-Romero et al., 1991; Baroja-Fernandez et al., 2003). Una vez en el plasto, sería sustrato del conjunto de enzimas encargadas de la elongación del polímero de almidón, de acuerdo con las reacciones enzimáticas descritas anteriormente. Sin embargo, aunque la SUS es capaz de producir ADPG y fructosa, a partir de sacarosa y ADP *in vitro* (Delmer, 1972), se considera que su función normal *in vivo* es la producción de UDP-Glucosa (UDPG) y fructosa (Streb et al., 2009).

A pesar de todas las evidencias experimentales recogidas en la bibliografía, no se puede descartar por completo un eventual papel de la enzima SUS en las síntesis de la ADPG en el citosol.

I.1.6.2. Degradación del almidón de reserva

El almidón de reserva acumulado en el endospermo de las semillas de cereales es degradado durante la germinación para nutrir el crecimiento de la nueva plántula.

En el momento de la germinación, el endospermo está constituido por células muertas, que perdieron la integridad celular tras la fase de secado de la semilla. La degradación del almidón en este tejido depende de las enzimas hidrolíticas del almidón liberadas al endospermo desde el escutelo y la aleurona, y de las β -amilasas, que son depositadas en el endospermo durante el desarrollo de la semilla y activadas durante la germinación por acción de las proteasas liberadas desde la capa de aleurona. El producto liberado de la degradación del almidón es principalmente la glucosa, que es captada por el escutelo y transferida al embrión (Zeeman et al., 2010).

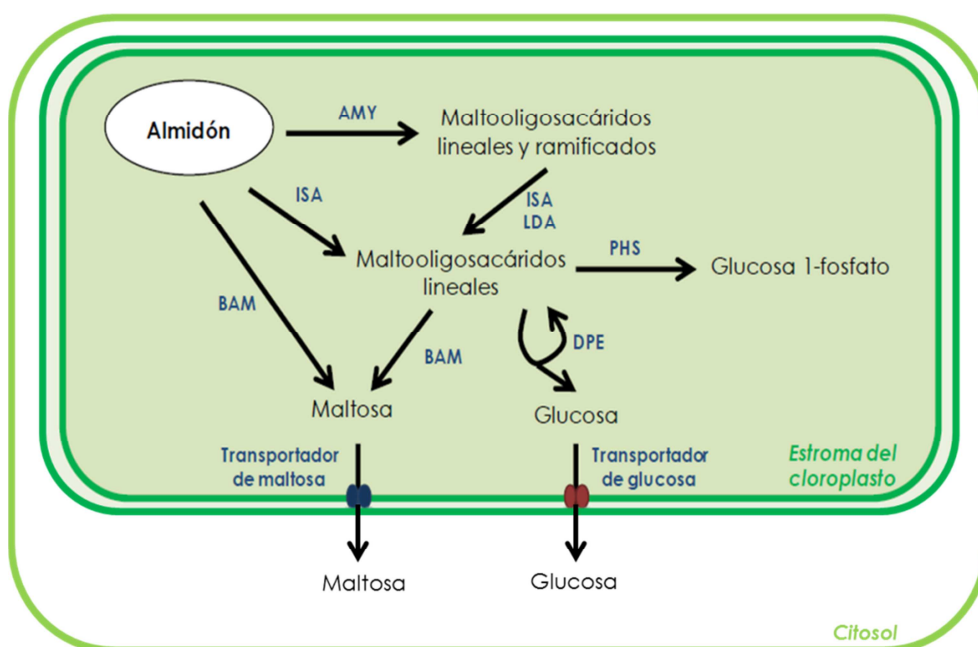


Figura I.12. Modelo de las rutas de degradación de almidón en células fotosintéticas

AMY, α -amilasa; **ISA**, isoamilasa; **BAM**, β -amilasa; **LDA**, pululanasa; **PHS**, fosforilasa; **DPE**, enzima desproporcionante. Adaptado de (Zeeman et al., 2007).

Los estudios bioquímicos revelan la presencia en el endospermo de cuatro enzimas relacionadas con la degradación del almidón: α -amilasa, β -amilasa, DBE y α -glucosidasa (maltasa) (Figura I.12). Las α -amilasas poseen un papel principal en la degradación del almidón en el endospermo. Estas enzimas inician la degradación del gránulo de almidón, probablemente en sitios específicos (poros) de la superficie del gránulo y gracias a su acción endoamilolítica se liberan una mezcla de oligosacáridos lineales y ramificados solubles. Estos son degradados por la acción de α -amilasas, DBEs y β -amilasas hasta maltosa y pequeños malto-oligosacáridos que a su vez son degradados a glucosa por las α -glucosidasas (maltasas)

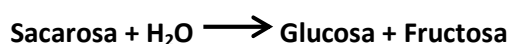
(Zeeman et al., 2010). Existen evidencias de que las α -glucosidasas pueden participar también junto con las α -amilasas para liberar directamente glucosa desde la superficie del gránulo (Sun and Henson, 1991).

I.1.6.3. Sacarosa sintasa

La enzima sacarosa sintasa (SUS) juega un papel esencial en la síntesis de almidón en los tejidos heterotróficos, donde cataliza el primer paso de la conversión de sacarosa en almidón. En estos tejidos, la SUS cataliza la degradación de sacarosa hasta UDPG y fructosa, que pueden ser metabolizados para la producción energética o ser incorporados en las rutas biosintéticas de polisacáridos (almidón, celulosa o fructanos) (Koch, 2004). Siendo la sacarosa la forma mayoritaria de carbono transportada en plantas, la SUS ha sido una enzima ampliamente estudiada desde su descubrimiento en 1955 (Cardini et al., 1955) debido a la importancia de su actividad enzimática en la distribución de los fotoasimilados en la planta.

Las semillas de cereales constituyen grandes reservorios de carbohidratos y como tales, durante su desarrollo, se convierten en importantes sumideros de fotoasimilados. La “fuerza sumidero” (*sink strength*) de un órgano se define como su capacidad de captación de fotoasimilados (Ho, 1988). Dado que la sacarosa es el fotoasimilado mayoritario en plantas, este concepto está fuertemente relacionado con la actividad SUS en las semillas de cereales, donde es la principal enzima encargada de la rotura de la sacarosa.

En plantas, además de la reacción catalizada por la SUS, existe otra vía para la degradación de la sacarosa catalizada por invertasas. Estas pueden clasificarse en base a su pH óptimo de actividad (ácida, neutra y básica), solubilidad de la enzima (soluble o insoluble) o localización celular (citoplasmática, vacuolar y de pared celular). Las invertasas catalizan la hidrólisis irreversible de la sacarosa en glucosa y fructosa:



Por el contrario, la SUS cataliza la rotura reversible de la sacarosa produciendo UDPG en vez de glucosa:



Ambas enzimas se encargan de la degradación de la sacarosa *in vivo*, pero los productos de sus reacciones difieren, así como el destino y función de los mismos. Las invertasas producen el doble de hexosas que la SUS, lo que les dota de la capacidad de estimular sensores de azúcares específicos cuya señal provoca una alteración en la expresión

de diversos genes. De este modo, las invertasas pueden actuar como fuertes efectores de una amplia variedad de procesos entre los que se incluyen la biosíntesis y percepción de hormonas como el ácido abscísico (ABA) (Koch, 2004).

Durante el desarrollo de los órganos de reserva de diversas plantas, como es el caso de las semillas de cereales, existe una distribución espacio-temporal diferencial de los dos tipos de enzimas degradativas de sacarosa (Dale and Housley, 1986; Koch, 2004). En la fase temprana del desarrollo del grano, la actividad hidrolítica de las invertasas es predominante, encontrándose mayoritariamente en el pericarpo. Esta actividad cesa cuando el endospermo comienza su fase lineal de crecimiento. En esta etapa inicial, la actividad invertasa incrementa la producción de hexosas provocando con ello un incremento de la respiración así como de las señales dependientes de azúcares que provocan la activación de diversos genes del desarrollo temprano, incluidos los implicados en la división celular. Tras la celularización del endospermo comienza la fase de crecimiento lineal del grano, momento en el que se produce un cambio en el uso de sacarosa, que es dirigida principalmente hacia la síntesis de almidón. En esta etapa de almacenamiento, la actividad SUS es predominante y contribuye no solo a la generación de UDPG para la síntesis de almidón sino que favorece una ruta respiratoria más eficiente (que utiliza una molécula de ATP por molécula de sacarosa en vez de dos en el caso de las invertasas) y minimiza la producción de hexosas y por tanto la señalización dependiente de estas, contraria a la diferenciación y maduración de la semilla.

La importante aportación de la SUS en el desarrollo de la semilla y, en concreto, su participación en la conversión de la sacarosa en almidón de reserva está apoyada por numerosos estudios desde la demostración, en 1976, de la drástica reducción en el contenido de almidón en granos de maíz mutante en un gen codificante de la SUS (*sh1*) que presentaban una actividad SUS reducida (Chourey and Nelson, 1976). Sin embargo, existe escasa documentación del papel de la SUS en la germinación de las semillas exceptuando un estudio realizado en semillas de maíz en germinación que concluyó que la SUS, localizada en el escutelo, estaría inhibida por la glucosa procedente del endospermo (Echeverría and Humphreys, 1985).

Además de dirigir la conversión de sacarosa en almidón en los órganos heterotróficos de la planta, la SUS participa en otros procesos importantes para la planta. Localizada en los tubos cribosos y células adyacentes del floema la SUS participa tanto en el transporte de sacarosa como en la biosíntesis de calosa de las placas cribosas. También se ha relacionado a la SUS con la formación de la pared celular, participando en la biosíntesis de diversos polisacáridos de pared. La asignación de esta función se basa en diferentes estudios donde se

demuestra la inhibición de la formación de la pared celular en mutantes deficientes de SUS en diferentes plantas como el maíz, la zanahoria o el algodón (Koch, 2004). En leguminosas la SUS adquiere además otras funciones relacionadas con el funcionamiento y mantenimiento de algunas simbiosis como son las micorrizas o los nódulos fijadores de nitrógeno (Koch, 2004). En estos últimos, la actividad SUS es esencial para la fijación del nitrógeno, aportando energía y esqueletos carbonados (Gordon et al., 1999).

Además, la posible participación de la SUS en la conversión directa de sacarosa en ADPG para la síntesis de almidón tanto en células fotosintéticas como heterotróficas (Baroja-Fernandez et al., 2003), suma importancia a esta enzima en semillas de cereales. Por último, merece la pena mencionar el valor nutricional que aporta la SUS en la alimentación humana, tanto por el contenido aminoacídico rico en lisina de esta proteína como por su elevada abundancia en semillas (Koch, 2004).

I.1.6.3.1. Familia génica y patrón de expresión de los genes *Sus*

Siendo la SUS una enzima que participa en tan diversos procesos, no es de extrañar que en la mayoría de plantas analizadas esté codificada por familias multigénicas cuyos miembros poseen un patrón de expresión diferencial. Por ejemplo, en la planta modelo de dicotiledóneas *Arabidopsis thaliana*, la familia génica *Sus* está compuesta por seis genes, igual que en la planta modelo en leguminosas *Lotus japonicus* (Horst et al., 2007). En el caso del algodón se han descrito hasta siete genes *Sus*, aunque uno de ellos, *GaSus2*, presenta niveles de expresión indetectables y se considera que se trata de un pseudogen (Chen et al., 2012). Entre las monocotiledóneas, se han descrito familias génicas *Sus* compuestas por seis genes en el caso del arroz (Hirose et al., 2008) y *Brachypodium distachyon*. En cebada se han descrito hasta el momento cuatro genes *Sus* aunque no se descarta la existencia de un número similar al de arroz y *Brachypodium* (Barrero-Sicilia et al., 2011). En otras monocotiledóneas como el maíz se han identificado una familia génica *Sus* compuesta por tres miembros (Carlson et al., 2002).

Los miembros de la familia de genes *Sus* en muchas especies de plantas son divergentes en función y se expresan diferencialmente durante el desarrollo de la planta. Por ejemplo, de los tres genes *Sus* en maíz, *Sh1*, *Sus1* y *Sus3*; *Sh1* se expresa mayoritariamente en el endospermo en desarrollo donde su función principal es la síntesis de la pared celular, mientras que *Sus1* se expresa en una amplia gama de tejidos en los que participa principalmente en la síntesis de almidón (Koch et al., 1992). En el caso de *Arabidopsis* los seis genes *Sus* presentan perfiles de expresión diferentes pero parcialmente solapantes y cada uno

de ellos lleva a cabo funciones específicas que fueron asignadas mediante un estudio exhaustivo de los correspondientes mutantes (Bieniawska et al., 2007). En el caso del arroz también se ha demostrado que los genes *Sus* poseen patrones de expresión específicos para cada tejido, dependientes de la fase de desarrollo (Wang et al., 1999; Hirose et al., 2008).

La expresión de los genes *Sus*, así como su regulación post-transcripcional, están influenciados por una gran variedad de factores ambientales y fisiológicos. Entre ellos, los niveles de azúcares y la concentración de oxígeno del medio son los principales moduladores de la expresión de estos genes, aunque dicha modulación ocurre de manera diferencial en las diferentes isoformas y entre especies. Numerosos estudios evidencian regulación de los genes *Sus* por azúcares (Koch et al., 1992; Koch, 1996; Dejardin et al., 1999; Koch et al., 2000; Baud et al., 2004). En maíz, los genes *Sh1* y *Sus1* responden diferencialmente a la abundancia y escasez de azúcares. La máxima expresión del gen *Sh1* se alcanza a bajos niveles de azúcares (~0.2% glucosa) mientras que *Sus1* muestra su máxima expresión con elevados niveles (2% glucosa). Otros azúcares metabolizables como la sacarosa y la fructosa tienen efectos similares sobre la expresión de estos genes, sin embargo, el manitol y otros azúcares no metabolizables no alteran su expresión (Koch et al., 1992). Especial en este sentido es la regulación de la expresión del gen *Sus1* de *Arabidopsis*, que se modifica debido a los cambios del potencial osmótico más que por la propia metabolización de los azúcares (Dejardin et al., 1999). En patata se ha demostrado que el primer intrón, así como las secuencias flanqueantes del gen, afectan la expresión de los genes *Sus* (Fu et al., 1995; Fu and Park, 1995). El efecto regulador del primer intrón podría deberse a la existencia de una secuencia homóloga a *SURE1*, un motivo conservado en numerosos genes modulados por sacarosa, que está presente también en las regiones promotoras de los genes *sus1* de *Arabidopsis*, maíz y arroz (Winter and Huber, 2000). Por otro lado también se ha demostrado la implicación de las proteínas kinasas SnRKs en la regulación por azúcares de la expresión de los genes *Sus* (Winter and Huber, 2000; Halford et al., 2003).

Otro aspecto que influye en la expresión de los genes *Sus* es el nivel de oxígeno (Koch et al., 2000; Koch, 2004) incrementándose bajo condiciones de hipoxia o anoxia (Taliencio and Chourey, 1989; Zeng et al., 1998; Dejardin et al., 1999; Koch et al., 2000; Bologa et al., 2003; Baud et al., 2004). Por ejemplo, la transcripción de los genes *Sh1* y *Sus1* de maíz se induce por hipoxia y anoxia, respectivamente (Zeng et al., 1998; Koch et al., 2000). Un aspecto interesante de la inducción de la transcripción gen *Sh1* de maíz en hipoxia es que los mRNA generados se unen a los ribosomas pero no son traducidos, sugiriendo que se trata de una estrategia de

prevención de la transcripción de otros genes durante el periodo de escasez de oxígeno (Talierto and Chourey, 1989).

Los genes *Sus* responden también ante diferentes estreses como son los provocados por las bajas temperaturas (Strand et al., 1997; Ricard et al., 1998; Baud et al., 2004), sequía (Geigenberger et al., 1997; Gordon et al., 1997; Dejardin et al., 1999; Baud et al., 2004), alta salinidad (Gordon et al., 1997; Balibrea et al., 2003), luz (Ciereszko et al., 2001) y/o heridas (Salanoubat and Belliard, 1989).

I.1.6.3.2. Localización subcelular de la SUS

La SUS se considera normalmente una proteína soluble en el citosol, aunque es un hecho comprobado la capacidad de la enzima de asociarse transitoriamente a las membranas celulares (Carlson and Chourey, 1996; Winter et al., 1997; Ruan et al., 2003; Hardin and Huber, 2004; Duncan et al., 2006; Hardin et al., 2006), lo que le permite participar en funciones específicas (Figura I.13). Por ejemplo, unida a la membrana plasmática la SUS estaría suministrando directamente UDPG para la síntesis de celulosa y callosa (Amor et al., 1995; Winter et al., 1997; Hardin and Huber, 2004). De hecho, existen numerosas evidencias de una posible asociación con la roseta del complejo celulosa sintasa (Amor et al., 1995). Unida al complejo de Golgi, se propone que la enzima es transferida a la pared celular, donde también se ha localizado (Salnikov et al., 2003), mediante un mecanismo de secreción mediado por las vesículas formadas en el complejo de Golgi (Persia et al., 2008). Una vez en la pared celular la SUS estaría participando en la síntesis de los polímeros de celulosa. Unida al tonoplasto la actividad SUS estaría relacionada con el uso y/o almacenamiento de la sacarosa vacuolar (Koch, 2004) y asociada al amiloplasto con el uso de la sacarosa como sustrato para la síntesis de almidón. La asociación de SUS a la membrana está controlada por diferentes factores como son el nivel de fosforilación de la proteína, la concentración de sacarosa o el pH del medio. De este modo, la fosforilación de determinados residuos de serina, mediada por proteínas kinasas dependientes de Ca^{2+} (CDPKs) y/o kinasas SnRK (Hardin et al., 2003), una alta concentración de sacarosa en el medio, así como un pH bajo han sido descritos como inductores la unión de SUS a membranas (Hardin and Huber, 2004; Hardin et al., 2006). Sin embargo, otros autores defienden que la fosforilación de la SUS favorece su disociación de la membrana debido a un cambio conformacional que resulta en una disminución de la hidrofobicidad que favorece su solubilización (Zhang et al., 1999; Winter and Huber, 2000). Otros trabajos demuestran por el contrario niveles similares de fosforilación de la proteína soluble y la unida a membrana (Haigler et al., 2001; Komina et al., 2002).

También se ha demostrado la asociación de la SUS con el citoesqueleto dada su capacidad de unión a la actina-F (Winter et al., 1998; Azama et al., 2003; Matic et al., 2004; Duncan and Huber, 2007), que puede entenderse como un mecanismo de desplazamiento intracelular de la enzima para llevar a cabo funciones específicas (Duncan and Huber, 2007). Entre los factores que promueven esta unión se encuentran la presencia de sacarosa, aunque niveles muy elevados de sacarosa son inhibidores. El estado de fosforilación de la proteína es otro de los factores descritos como moduladores de dicha unión aunque existen discrepancias sobre si la capacidad de unión de la SUS fosforilada a los filamentos de actina incrementa (Winter et al., 1998) o se inhibe (Duncan and Huber, 2007).

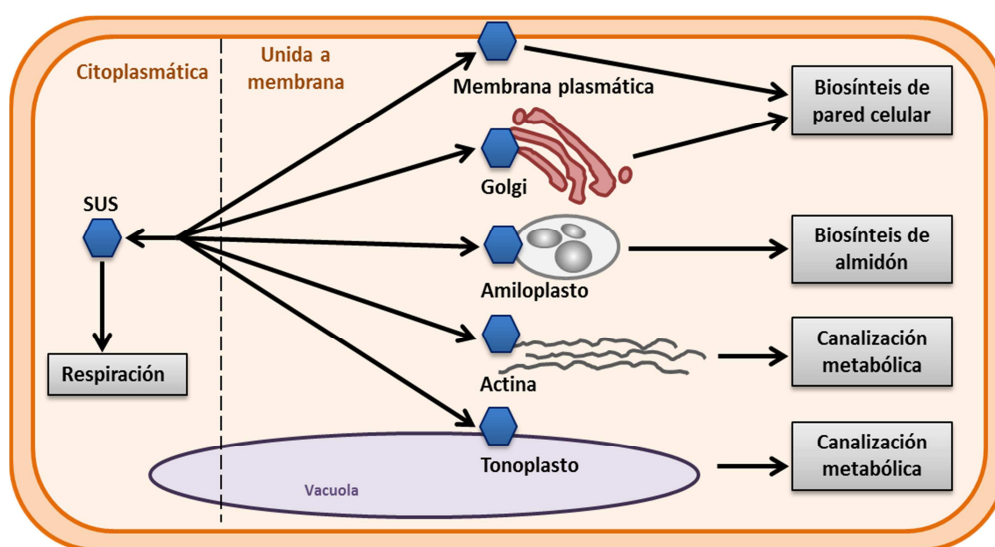


Figura I.13. Regulación de la actividad sacarosa sintasa (SUS) según la localización subcelular

La asociación transitoria de SUS con las membranas, orgánulos y actina permiten la realización de funciones especiales como son la biosíntesis de celulosas y xilanos (en la membrana plasmática y aparato de Golgi), biosíntesis de almidón (en los amiloplastos), la canalización metabólica (unida a los filamentos de actina) o la posible compartimentalización y/o movilización de la sacarosa en la vacuola (en el tonoplasto). Esquema adaptado de (Koch, 2004).

Además existen evidencias de que la SUS forma parte del proteoma mitocondrial en maíz, donde estaría ejerciendo funciones diferentes al catabolismo de la sacarosa (Subbaiah et al., 2006). Se propone que la SUS podría estar participando en la señalización por azúcares a través de la regulación de los canales aniónicos dependientes de voltaje mitocondriales (Azoulay-Zohar et al., 2004). Por otro lado, también se ha identificado a la SUS en el cloroplasto donde se le asigna la participación en la regulación de los procesos fotosintéticos (Gerrits et al., 2001; Oswald et al., 2001).

I.1.6.3.3. Características físico-químicas y bioquímicas de la actividad enzimática

Los monómeros de SUS poseen generalmente una masa molecular de 90-94 kDa, si bien, se han identificado isoformas con valores mayores (100 kDa) (Oliveira do Nascimento et al., 2000) y menores (80 kDa) (Sebkova et al., 1995). La forma activa de la enzima es el tetrámero, aunque parece que es capaz de formar dímeros (Duncan and Huber, 2007) e incluso se ha descrito la formación de formas más agregadas, como hexámeros y octámeros, en condiciones de baja fuerza iónica del medio (Su and Preiss, 1978). Entre los factores que controlan la formación del tetrámero se ha demostrado que la concentración de sacarosa es el principal promotor de la oligomerización. En ausencia de sacarosa el pH también influye en la oligomerización, de modo que un pH bajo (6.0) promueve la formación del tetrámero mientras que un pH alto (8.5) la dimerización y monomerización (Duncan and Huber, 2007). En plantas como el maíz y el arroz se han identificado tanto homotetrámeros como heterotetrámeros.

Como se ha descrito anteriormente, la sacarosa sintasa cataliza la rotura reversible de la sacarosa en UDPG y fructosa. Sin embargo, aunque la enzima es capaz de catalizar la reacción reversible libremente, con valores de ΔG descritos entre $-1,4$ y $-4,7 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ para la reacción de síntesis de sacarosa (Geigenberger and Stitt, 1993), la principal función biológica es la rotura de sacarosa en los órganos sumidero, que está favorecida por las elevadas concentraciones de sacarosa (Koch et al., 1992). La SUS no es estricta en el uso de sustratos para la rotura de la sacarosa, siendo capaz de utilizar una amplia gama de nucleósidos difosfato: UDP, ADP, TDP, CDP o GDP, aunque el UDP es el sustrato más eficiente y con el que se obtienen los valores más bajos de K_M (Delmer, 1972; Romer et al., 2004). Romer et al. (2004) en un estudio realizado con SUS1 recombinante de patata demostraron que la preferencia de uso de nucleótido para esta enzima era $\text{UDP} > \text{dTDP} > \text{ADP} > \text{CDP} > \text{GDP}$ en el sentido de rotura de la reacción. El pH óptimo de la reacción en el sentido de rotura es 6.0-6.5 y en el sentido de síntesis 8.0-9.0 (Pressey, 1969).

Los parámetros cinéticos de la actividad SUS varían ampliamente entre diferentes especies e isoformas, aunque mantienen algunas tendencias generales. Para una determinada SUS los valores de K_M para la sacarosa son los mayores, seguidos de los de la fructosa y de los sustratos UDP y UDPG. Valores aproximados de los diferentes sustratos son: para la sacarosa 31-100 mM, para la fructosa 1,1-20,9 mM, para la UDPG 0,03-1,3 mM y para el UDP 0,02-0,39 mM (Sebkova et al., 1995; Barratt et al., 2001; Bieniawska et al., 2007). Las diferentes isoformas de SUS muestran diferente sensibilidad a la inhibición. Generalmente, las SUS muestran inhibición por sustrato con fructosa y UDPG (Sebkova et al., 1995; Bieniawska et al., 2007). La glucosa es un competidor acompetitivo con respecto a la fructosa y la UDPG

(Doehlert, 1987). Los iones divalentes Ca^{2+} y Mg^{2+} normalmente producen inhibición en el sentido de rotura de la sacarosa, si bien, el grado de inhibición varía según la especie. Sin embargo, en la dirección de síntesis de sacarosa, los iones Ca^{2+} y Mg^{2+} tienen un efecto estimulador (Huang and Wang, 1998; Tanase and Yamaki, 2000). Además, como otras muchas enzimas, la SUS está fuertemente inhibida por Cu^{2+} , Zn^{2+} y Hg^{+} (Elling, 1995).

I.1.6.3.4. Regulación de la actividad SUS

La SUS está sujeta a modificaciones postraduccionales como fosforilación y regulación redox, capaces de modular su actividad y estabilidad. Las primeras observaciones de que la SUS podía ser objeto de fosforilación reversible las realizaron Shaw y colaboradores en 1994 (Shaw et al., 1994). La fosforilación ocurre en un residuo de serina del extremo N-terminal de la proteína (Huber et al., 1996; Zhang and Chollet, 1997). El sitio de fosforilación está conservado en casi todas las isoformas de dicotiledóneas y monocotiledóneas: -L-[STA]-R-[LV]-H-S*-[VLQ]-R (Winter and Huber, 2000). Diferentes estudios demostraron que la fosforilación de la SUS provoca un ligero incremento de su actividad enzimática en el sentido de rotura de la sacarosa, no teniendo ningún efecto sobre la actividad sintética (Huber et al., 1996; Winter et al., 1997; Nakai et al., 1998). Por el contrario, un estudio realizado con SUS recombinante de soja concluyó que la fosforilación no afectaba ni a su actividad ni a sus propiedades cinéticas y que tan solo provoca un cambio en la hidrofobicidad que altera su capacidad de unión a la membrana (Zhang et al., 1999). La fosforilación de esta serina predispone a la SUS a una segunda fosforilación (en la Ser170 o equivalente) que promueve la degradación de la proteína mediada por el proteasoma (Hardin et al., 2003).

La actividad SUS también está sujeta a regulación redox mediante la formación reversible de puentes disulfuro (Pontis et al., 1981; Rohrig et al., 2004; Marino et al., 2008). En un estudio llevado a cabo en trigo se demostró que la actividad SUS se modifica por la acción de agentes redox, incrementando su actividad en sentido de rotura en presencia de agentes reductores (GSH y DTT) y disminuyéndola con la adición de agentes oxidantes (GSSG y Trxs oxidadas). La actividad SUS en sentido de síntesis de sacarosa, en cambio, no varía en función del estado redox. Se propuso que debían existir grupos tiólicos implicados en el mantenimiento de una conformación del sitio activo, cuya oxidación o reducción modifica la actividad de rotura de la SUS (Pontis et al., 1981). Similares resultados se obtuvieron en nódulos fijadores de nitrógeno de leguminosas, donde la inducción artificial de producción de ROS, y por tanto de un estrés oxidativo, provocaba una disminución de la actividad de rotura de la SUS (Marino et al., 2008). Ensayos *in vitro* con SUS de nódulos fijadores de nitrógeno de

leguminosas demostraron que la oxidación de la enzima lleva a una disminución de su actividad en sentido de rotura de sacarosa, y que la reversión de la oxidación con agentes reductores provoca una recuperación de su actividad normal (Marino et al., 2008). Según estos resultados, la actividad SUS *in vivo* estaría regulada por la formación reversible de puentes disulfuro, sin embargo, el mecanismo implicado en esta regulación redox aún se desconoce.

I.2. OBJETIVOS

El objetivo central de este trabajo ha sido identificar procesos sometidos a regulación redox mediada por NTRC en tejidos no fotosintéticos de plantas de interés agronómico, en concreto, en el endospermo de semillas de cereales. Para llevar a cabo este estudio se han planteado las siguientes líneas de trabajo:

- Estudio del patrón de expresión de *Ntrc* en los cereales modelo *Oryza sativa* y *Triticum aestivum*.
- Caracterización de NTRC de endospermo de semillas de cereales y localización subcelular en este tejido.
- Identificación de las proteínas diana de NTRC en endospermo de semillas de cereales.
 - Clonación y caracterización de tres proteínas diana de NTRC identificadas, las isoformas 1, 2 y 3 de la sacarosa sintasa de arroz.
 - Estudio de la participación de NTRC en la regulación redox de la sacarosa sintasa.

Parte de los resultados que se exponen en este trabajo han sido publicados en los siguientes artículos y aportaciones a congresos:

- Francisco Javier Cejudo, Julia Ferrández, **Beatriz Cano**, Leonor Puerto-Galán, Manuel Guinea (2012) The function of the NADPH thioredoxin reductase C-2-Cys peroxiredoxin system in plastid redox regulation and signalling. *FEBS Lett.* 586 (18): 2974-2980.
- **Beatriz Cano**, José María Romero, Francisco Javier Cejudo. *Redox control of the carbon flux in cereal endosperm*. 22th IUBMB & 37th FEBS Congress, Sevilla, 2012.
- **Beatriz Cano**, Julia Ferrández, Maria de la Cruz González, José María Romero, Francisco Javier Cejudo. Regulación redox de la síntesis de almidón en endospermo de arroz. (poster). X RBMP (Reunión de Biología Molecular de Plantas), Valencia, 2010.
- Kerstin Kirchsteiger, Manuel Guinea, Julia Ferrández, **Beatriz Cano**, Belén Pascual, Maria de la Cruz González, Francisco Javier Cejudo. *NTRC is a redox switch for oxidative stress response, starch metabolism and hormone signalling in Arabidopsis thaliana*. “2nd EMBO Conference on Plant Molecular Biology”, Cádiz, 2009.
- **Beatriz Cano**, María Teresa Ruiz, José María Romero, Francisco Javier Cejudo. La ADP-Glucosa-pirofosforilasa y la NTRC muestran el mismo patrón de localización en semillas de cereales. IX RBMP (Reunión de Biología Molecular de Plantas), Santiago de Compostela, 2008.

II.MATERIALES Y MÉTODOS

II.1. MATERIAL VEGETAL

En el desarrollo de este trabajo se han utilizado las especies de cereales *Oryza sativa*, Subsp. Japónica y *Triticum aestivum*, var. Chinese Spring. Además, se ha utilizado la planta modelo *Nicotiana benthamiana* como sistema para la agro-expresión de proteínas recombinantes en plantas.

II.1.1. Esterilización de las semillas

Las semillas de arroz o de trigo se esterilizaron incubándolas en NaOCl al 3% (v/v) durante 20-30 min. Posteriormente se sometieron a dos lavados sucesivos con agua destilada estéril, un lavado con HCl 0,01 M estéril y finalmente cinco lavados con agua destilada estéril (Abdul-Baki 1974).

II.1.2. Germinación de las semillas y condiciones de cultivo

En los experimentos de germinación, las semillas de arroz o de trigo, previamente esterilizadas, se incubaron en placas Petri provistas de papel de filtro humedecido con agua destilada estéril, a temperatura ambiente (22 a 25°C) y durante los tiempos indicados en cada experimento.

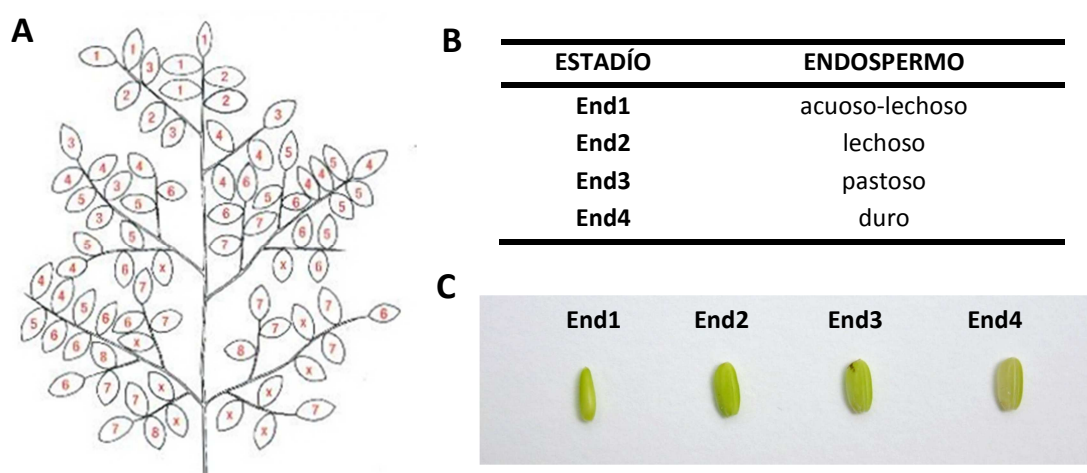


Figura II.1. Desarrollo y clasificación de las semillas de arroz

(A) Representación esquemática del orden de floración de las espigas de una panícula (la floración se completa en unos 8 días) donde las flores con x no abren (Aguilar, 2001). (B) y (C) Clasificación de las semillas de arroz realizada en este trabajo según el grado de desarrollo del endospermo.

El cultivo de las plantas de arroz se realizó en las instalaciones de cultivos piloto CIFA Las Torres (Consejerías de Agricultura, Junta de Andalucía), Sevilla. Las semillas se sembraron por duplicado en balsetas (4 x 4 m) al aire libre y en condiciones de cultivo de campo. Una de

las balsetas, utilizada como control, se regó con agua, mientras que la otra se regó con agua suplementada con 2,5 g/L de NaCl durante todo el desarrollo de la planta.

La recogida de las semillas se realizó durante la fase de llenado y maduración del grano, se congelaron inmediatamente en N₂ líquido y se almacenaron a -80°C hasta el momento de su uso. Las panículas recogidas en esta fase de desarrollo contienen granos en diferentes grados de madurez, madurando antes los granos de la parte alta de la panícula, y de fuera hacia adentro. Las semillas recolectadas se clasificaron en 4 estadios de desarrollo (Figura II.1).

Para la obtención de semillas de trigo en distintas fases de desarrollo, se dejaron germinar las semillas en placas provistas de papel de filtro humedecido con agua destilada estéril durante 2 días a 25°C en la cámara de cultivo. Posteriormente se mantuvieron en oscuridad a 4°C durante 3 días. Finalmente las semillas germinadas se trasplantaron a macetas conteniendo turba vegetal y se cultivaron en invernadero con una temperatura entre 22 y 25°C, una humedad relativa del 60% y un fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad. Bajo estas condiciones la espiga se forma aproximadamente a las 10 semanas de cultivo. Tras la aparición de los estambres (anthesis) se recogieron semillas en distinto grado de desarrollo, hasta los 30-35 días post-anthesis (dpa), momento en el que se completa el desarrollo de la semilla (Figura II.2).

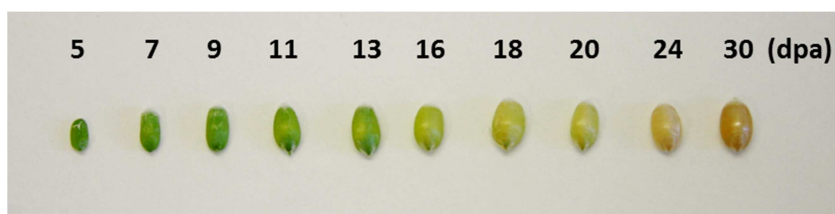


Figura II.2. Semillas de trigo en desarrollo hasta los 30 días post-anthesis (dpa)

II.1.3. *Nicotiana benthamiana*

El cultivo de *Nicotiana benthamiana* se realizó en invernadero germinando las semillas en alveolos conteniendo turba vegetal. Una vez germinadas se trasplantaron a macetas donde completaron su desarrollo. Las plantas crecieron en fotoperiodo de día largo (con 16 h de luz), a una humedad relativa del 60% y a una temperatura entre 22 y 25 °C.

II.2. BACTERIAS

II.2.1. Estirpes utilizadas

Las estirpes de *Escherichia coli* empleadas en este trabajo, junto con sus características genotípicas más relevantes, se relacionan en la Tabla II.1. La estirpe DH5 α se utilizó rutinariamente para la clonación de plásmidos. Las estirpes XL1-Blue y BL21 se utilizaron para la producción de proteínas recombinantes por inducción con IPTG. Para la expresión transitoria de proteínas recombinantes en *Nicotiana benthamiana* se utilizó la estirpe de *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 pGV2260. El almacenamiento de las construcciones en las bacterias se realizó al 20% de glicerol a -80°C.

Tabla II.1. Estirpes de *E. coli* utilizadas en este trabajo

Estirpes	Genotipo	Referencias
DH5α	<i>supE44 ΔlacU169 (ϕ80lacZ ΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	(Hanahan, 1983)
BL21(DE3)	<i>hsdS gal [lclts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1]</i>	(Studier and Moffatt, 1986)
XL1-Blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi-1 relA1 lac⁻ F' [proAB⁺ lacI^d lacZ M15 Tn10 (tet^r)]</i>	(Bullock et al., 1987)

II.2.2. Cultivo en medio líquido y sólido

Las bacterias se cultivaron a 37°C (*E. coli*) o 30°C (*Agrobacterium*) en incubadores con agitación a 200 rpm. En ambos casos se utilizó el medio de cultivo Luria-Bertani (LB) (Sambrook, 1989) cuya composición es NaCl 10 g/L, bactotriptona 10 g/L y extracto de levadura 5 g/L. Para el cultivo en medio sólido el medio LB se solidificó con Bacto-agar al 1,5% (p/v).

Para el cultivo y selección de cepas portadoras de plásmidos, el medio LB se suplementaba con 100 μ g/mL de ampicilina (Ap) o 50 μ g/mL de kanamicina (Km) en el caso de *E. coli*; y con 50 μ g/mL de kanamicina (Km) o 25 μ g/mL de rifampicina (Rif) en el caso de *Agrobacterium*. Estos antibióticos fueron esterilizados por filtración con filtros MILLEX®GP (MILLIPORE) de 0,2 μ m de diámetro de poro.

II.2.3. Obtención de células competentes

La preparación de células competentes, realizadas en nuestro laboratorio o suministradas por el servicio de cultivos del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, se llevó a cabo por dos métodos diferentes.

Para la obtención de células competentes electroporables de la cepa BL21(DE3) de *E. coli* y de *Agrobacterium* se siguió el protocolo descrito a continuación. Se prepararon cultivos de 500 mL de medio LB suplementado con el antibiótico adecuado, en el caso de las cepas de *E. coli*, o de medio YENB [*bacto yeast extract* 0,75% (p/v), *bacto nutrient broth* 0,8% (p/v)] suplementado con rifampicina (50 µg/mL) para *Agrobacterium*, dejándolos alcanzar una DO₆₀₀ de 0,5-0,9. Posteriormente se recogieron las células por centrifugación a 3500 *xg* durante 10 min a 4°C, se lavaron dos veces con 100 mL de agua fría y una vez con 20 mL de glicerol 10% (v/v). Finalmente se resuspendieron en 2-3 mL de glicerol 10% (v/v) frío y se distribuyeron en volúmenes de 40 µL.

La obtención de células competentes de la cepa DH5α de *E. coli* para la transformación por choque térmico (Sambrook, 1989) consistió en cultivar las células en 5 mL de medio LB durante 12 h, con agitación, a 37°C. De este cultivo se utilizaron 0,5 mL para inocular 50 mL de medio LB que se cultivaron a 37°C con agitación durante 90 min. Las células se recogieron por centrifugación a 2000 *xg* durante 10 min a 4°C y se resuspendieron en 15 mL de CaCl₂ 100 mM frío. Tras enfriar en hielo 40 min, se centrifugaron de nuevo (2000 *xg*, 5 min, 4°C), resuspendiendo las células en 5 mL de CaCl₂ 100 mM. Tras enfriar en hielo durante 1-3 h, se añadió 1 mL de glicerol frío. La mezcla se repartió en alícuotas de 200 µL que se almacenaron a -80°C hasta su uso.

II.3. MÉTODOS DE MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE DNA

II.3.1. Clonación de cDNAs

Los cDNAs utilizados en este trabajo se amplificaron por PCR utilizando Taq Polimerasa de alta fidelidad (*iProof*, BioRad) con el protocolo indicado por el fabricante.

Para la clonación mediante el sistema *Gateway*® (Invitrogen) (método de clonación por recombinación de secuencias homólogas) se introdujeron las secuencias de recombinación attB1/attB2 en el cDNA por PCR utilizando Taq Polimerasa de alta fidelidad (*iProof*, BioRad). A continuación se clonaron en el vector pDONR207 (Invitrogen) mediante una reacción de recombinación con la enzima BP clonasa II (Invitrogen) según el protocolo indicado por el fabricante. Generados los plásmidos, se introdujeron en la cepa de *E. coli* DH5α, como se describe en el apartado II.3.2. Tras comprobar las colonias positivas por PCR (apartado II.3.9) y confirmar la secuencia del inserto (apartado II.3.10) se procedía a subclonar el inserto clonado en los vectores binarios pGWB8 (--promotor 35S-R1-CmR-ccdB-R2-6xHis--) y pGWB9 (--promotor 35S-6xHis-R1-CmR-ccdB-R2--) mediante recombinación con la enzima LR clonasa II (Invitrogen). Con estos vectores binarios se transformaba la estirpe C58C1 de *A. tumefaciens*

(apartado II.3.2), que se utilizó para la expresión transitoria de proteínas en *Nicotiana benthamiana*.

En otros casos, el cDNA amplificado se clonó en el vector de selección pGEMt (Promega) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Posteriormente se subclonaron en el vector de expresión pQE30 (*Qiagen*) para proceder a la inducción de la expresión de la proteína correspondiente en bacterias.

II.3.2. Métodos de transformación genética

La transformación por choque térmico se realizó mezclando 200 μ L de células competentes, previamente descongeladas, con el DNA (<100 ng en un volumen inferior a 10 μ L). La mezcla se incubó en hielo durante 15-20 min y se sometió a un choque térmico de 42°C durante 90 s. Finalmente, tras añadirle 800 μ L de medio LB, se incubó durante 1 h a 37°C con agitación, sembrándose después en medio LB sólido suplementado con el antibiótico adecuado para selección de colonias positivas.

En los casos en los que se pretendía seleccionar transformantes del vector pGEMt por color (Sambrook, 1989), el medio sólido se suplementaba con IPTG 0,8 mM (Sigma) y X-gal 0,1 mM (Sigma). Mediante este método podemos identificar clones portadores de moléculas recombinantes gracias a la inactivación por inserción del gen *lacZ*. Las colonias con plásmidos recombinantes mostraron color blanco, frente al color azul de las que no lo portaban.

La transformación por electroporación se llevó a cabo en cubetas de 2 mm (*cell projects*) con el programa asistido del equipo Easyject óptimo (EQUIBIO) con un pulso de 2.500 V durante 19,1 ms. De inmediato se añadió LB a las bacterias y se crecieron durante 1 h a 37°C antes de sembrarlas en varias diluciones en placas de medio LB suplementado con el antibiótico adecuado.

II.3.3. Aislamiento de plásmidos de *E.coli*

Para la obtención de DNA plasmídico a pequeña escala se utilizó el kit de minipreparación de iNtRON y se siguieron las instrucciones del fabricante. La cantidad y calidad del DNA obtenido mediante este método es óptimo para su posterior uso.

II.3.4. Aislamiento de DNA total de tejidos vegetales

Para el aislamiento de DNA total, el material vegetal previamente triturado y congelado con ayuda de nitrógeno líquido se mezcló con 500 μ L de tampón de extracción [Tris-

HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 100 mM, EDTA 50 mM, β -Mercaptoetanol 1% (v/v), SDS 2% (p/v)] y se homogeneizó con ayuda de un vortex. A continuación se incubó durante 15 min a 45°C y posteriormente a temperatura ambiente durante 30 min. Tras la incubación se añadió el mismo volumen de fenol:cloroformo, se mezcló durante unos minutos y se centrifugó durante 10 min a 1.250 xg a 4°C. La fase acuosa se transfirió a otro tubo y se mezcló con dos volúmenes de etanol absoluto frío y se dejó incubar durante 30 min a -20°C para facilitar la precipitación del DNA. A continuación se centrifugó (10 min, 1.250 xg) y el precipitado obtenido se lavó con etanol al 70% (v/v), se dejó secar y se disolvió en 200 μ L de TE con RNAsa A (50 μ g/mL) y se almacenó a -20°C hasta su uso.

II.3.5. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

La separación de fragmentos de DNA se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa según se describe en Sambrook (1989), que se prepararon en tampón TBE (Tris-borato 45 mM, EDTA 2 mM pH 8,0). La concentración de agarosa en los geles varió entre el 0,8% y el 1,5% (p/v), dependiendo del rango de resolución deseado. Las electroforesis se llevaron a cabo en cubetas de electroforesis horizontal *Wide Mini-Sub Cell* GT (BioRad). Previamente, las muestras se suplementaron con tampón de carga 10x compuesto por azul de bromofenol al 0,4% (p/v) y Ficoll al 25% (p/v). Como patrones de tamaño se utilizó la mezcla *100 bp molecular ruler* (BioRad) y preparaciones de restricciones de DNA del fago λ . Para la detección del DNA se añadió bromuro de etidio a los geles a una concentración final de 0,5 μ g/mL, y se visualizó con un transiluminador de luz ultravioleta (BioRad).

II.3.6. Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa

Los fragmentos de DNA, una vez separados por electroforesis, se cortaron del gel de agarosa bajo luz ultravioleta (UV) y se extrajeron mediante el procedimiento de *FavorPrep™ GEL/PCR Purification Mini Kit* (Favorgen, Biotech Corp.).

II. 3.7. Restricción del DNA

Las enzimas de restricción utilizadas en este trabajo fueron suministradas por Takara, salvo excepciones. Las reacciones se llevaron a cabo según las condiciones recomendadas por los fabricantes.

II.3.8. Ligación de fragmentos de DNA

La ligación de fragmentos de DNA con extremos cohesivos se realizó mezclando preparaciones de los fragmentos a ligar con DNA ligasa del bacteriófago T4 (USB). La reacción se llevó a cabo en un volumen de 10 μ L utilizando el tampón suministrado por la firma comercial y se incubó a 16°C durante 16 h.

II.3.9. Amplificación de fragmentos de DNA por PCR

Para llevar a cabo la amplificación de DNA por PCR se utilizó un juego de reactivos suministrado por Promega. En un tubo *Eppendorf* de 0,2 mL se añadían 5 μ L del tampón de amplificación 10x, 1 o 2 μ L del DNA molde según se requería, 2 μ L de una mezcla de los cuatro desoxirribonucleótidos (cada uno a una concentración final de 5 mM), 50 pmoles de cada uno de los cebadores específicos, 1 U de *Taq* polimerasa (*GoTaq® DNA polymerase*, Promega) y agua ultrapura (Milli-Q50) hasta completar un volumen de 50 μ L. Esta mezcla, una vez desnaturalizado el DNA (95°C, 2 min), se sometió a 25-35 ciclos sucesivos de los siguientes pasos: desnaturalización del DNA molde (95°C, 0,5-1 min), reasociación de los cebadores (50-65°C, 0,5-1 min) y polimerización (72°C, 1min/kb). Por último, se incubaba a 72°C durante 5-10 min. Los cebadores de secuencia específica fueron sintetizados por Sigma-Amersham.

II.3.10. Secuenciación automática de DNA

La secuenciación del DNA de doble cadena clonado en el curso de este trabajo se realizó por el servicio de secuenciación de Secugen, Madrid.

II.4. MÉTODOS DE PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE RNA Y cDNA

II.4.1. Tratamiento del material

Para evitar la degradación del RNA por acción de RNAsas se tomaron las siguientes precauciones: todo el material utilizado, excepto el material de plástico, se esterilizó por calentamiento a 200°C durante 2 h en un horno y todas las disoluciones utilizadas, excepto los tampones Tris, se prepararon con H₂O-DEPC (H₂O suplementada con DEPC al 0,1% (v/v), incubada con agitación a temperatura ambiente durante 12 h y autoclavada). El material de plástico utilizado se esterilizó en autoclave o era material comercial ya estéril y libre de RNAsas.

II.4.2. Aislamiento de RNA de plantas

II.4.2.1. Aislamiento de RNA de hojas

La extracción de RNA total de hojas de cereales se llevó a cabo con Trizol (Invitrogen), reactivo compuesto por una mezcla de fenol y tiocianato de guanidinio que permite obtener un aislamiento de alta eficiencia en poco tiempo. Aproximadamente 0,4 g del material vegetal previamente triturado y congelado se dispuso en un tubo *Eppendorf* en presencia de nitrógeno líquido. Se añadió 1 mL de Trizol, la mezcla se homogeneizó con ayuda de un vortex y se incubó 5 min a temperatura ambiente. A continuación se añadieron 200 μ L de cloroformo y, tras agitar vigorosamente durante 15 s, se centrifugó (1.250 xg , 15 min). Posteriormente se precipitó el RNA presente en la fase acuosa mediante la adición de isopropanol (1 volumen) incubando durante 15 min a temperatura ambiente. Tras centrifugar (1.250 xg , 15 min) se obtuvo un precipitado que se resuspendió en 750 μ L de LiCl 3M, agitando durante 10 min. Tras este periodo se volvió a centrifugar (15.000 xg , 10 min) y el precipitado se lavó con etanol al 85% (v/v) y se resuspendió en 20 μ L de H₂O-DEPC. Por último se calentaron las muestras a 65°C durante 15 min para facilitar su resuspensión.

II.4.2.2. Aislamiento de RNA de endospermo

Para la extracción de RNA de endospermo de semillas de cereales se siguió el método descrito por Baulcombe and Buffard en 1983. Una vez recogidas las espigas se congelaron en nitrógeno líquido, se clasificaron las semillas y se guardaron a -80°C hasta su utilización. Hasta 1 g de dicho material vegetal se trituró en un mortero, en presencia de nitrógeno líquido, hasta obtener un polvo fino que se transfirió a un tubo de polipropileno de 15 mL (Falcon) que contenía 5 mL de tampón de extracción (NaCl 0,1 M, Tris-HCl 50 mM pH 9,0, EDTA 10 mM, SDS al 2% (p/v), 2-Mercaptoetanol 14 mM y 0,1 mg·mL⁻¹ de proteinasa K (Boehringer) y se procedió a su homogenización. Tras incubar 5-10 min a 4°C se sometió a extracción con fenol:cloroformo 3 veces. El RNA contenido en la fase acuosa de la última extracción se precipitó por la adición de 10 mL de etanol absoluto frío y posterior incubación a -20°C durante al menos 1 h. Tras centrifugar a 2.500 xg durante 10 min se obtuvo un precipitado que contenía el RNA. El precipitado se lavó con etanol al 70%, se volvió a centrifugar (2.500 xg , 10 min) y se resuspendió en 250 μ L de H₂O-DEPC. A continuación se añadió 25 μ L de acetato sódico 3 M pH 5,2 y se centrifugó a 4.500 xg durante 10 min. El sobrenadante se pasó a un tubo *Eppendorf* y se precipitó con 0,6 volúmenes de LiCl 3 M durante 1 h a 4°C. Se centrifugó a 15.000 xg durante 20 min, el precipitado se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en 50 μ L de H₂O-DEPC.

II.4.3. Aislamiento de RNA Poli(A)⁺

El aislamiento de mRNA se realizó con el Kit Oligotex[®] mRNA (Qiagen) para la purificación de poli-A⁺ RNA a partir de RNA total siguiendo las instrucciones especificadas por el fabricante. La cantidad de RNA total de partida era habitualmente 250 µg.

II.4.4. Cuantificación del RNA

Para cuantificar la concentración del RNA se determinó la absorbancia a 260 nm y 280 nm, frente a un blanco de agua en un micro espectrofotómetro *nanodrop*[®] (Nanodrop Technologies). La relación DO₂₆₀/DO₂₈₀ indica si existe contaminación con DNA, cuando es menor de 1,85.

II.4.5. Electroforesis de RNA

Para comprobar el estado del RNA, una muestra de 1 µg se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2% (p/v) en tampón TBE. Previamente, las muestras se suplementaron con tampón de carga 10x compuesto por azul de bromofenol al 0,4% (p/v) y Ficoll al 25% (p/v). Para la detección del RNA se añadió bromuro de etidio a los geles a una concentración final de 0,5 µg/mL, y se visualizó con un transiluminador de luz ultravioleta (BioRad). Cuando el RNA no estaba degradado se observaban dos bandas mayoritarias y definidas, correspondientes a los rRNA 18S y 28S.

Las muestras de RNA para análisis por *Northern blot* se prepararon y separaron en condiciones desnaturalizantes. A las muestras, 10 µg de RNA total, se les añadió un tampón de muestra que contenía 20 mM MOPS pH 7,0, 1 mM EDTA, 5 mM acetato sódico, 25% formamida y 3,3% formaldehído y se desnaturalizaron durante 10 min a 65°C. Tras enfriar en hielo se les añadió 1/10 volumen de muestra de glicerol al 50% con azul de bromofenol.

El tampón de electroforesis contenía 20 mM MOPS pH 7,0, 1 mM EDTA, 5 mM acetato sódico. La separación electroforética de los RNA se realizó en un gel de agarosa al 1%, disuelto en una disolución de tampón de electroforesis suplementado con formaldehído al 6,4% a 40 V constantes de 2 a 4 h.

II.4.6. Hibridación de RNA mensajero con sondas radiactivas

- **Transferencia de RNA a una membrana de nylon (*Northern blot*)**

Tras tres lavados con agua estéril, el gel se equilibró 10 min en tampón de transferencia SSC 1x (150 mM cloruro sódico y 15 mM acetato sódico). La transferencia de los RNA a una membrana de nylon Hybond N (Amersham Biosciences) se realizó por capilaridad: sobre un puente de papel Whatman 3 MM sumergido en tampón de transferencia se colocó el gel y encima se extendió la membrana de nylon y tres papeles Whatman 3 MM, todos recortados al tamaño del gel. Finalmente se colocó papel absorbente para ejercer la fuerza de succión y transferir el RNA a la membrana. Al día siguiente, tras fijar el RNA en la membrana mediante rayos UV en un horno (BLX-254, Vilber Lourmat), se tiñó el filtro con azul de metileno para comprobar la eficiencia de la transferencia y la carga de RNA.

- **Hibridación de RNA mensajero con sondas específicas**

La membrana se prehibridó con tampón *church* [1 M tampón fosfato de sodio pH 7,2; 7% SDS (p/v) 1% BSA (p/v)] a 65°C durante 2 h mínimo. A la solución de prehibridación se añadió la sonda marcada con *high prime*[™] polimerasa (Roche) (Tabla II.2), según condiciones indicadas por el fabricante y se hibridó toda la noche a 65°C. Al día siguiente se procedió a los lavados del filtro en soluciones de concentraciones decrecientes de SSC y SDS al 1% hasta obtener una señal radiactiva localizada. La membrana se dejó secar, y el resultado se visualizó mediante exposición en película fotográfica Kodak Biomax MS film (Kodak) o mediante exposición a una pantalla sensible a partículas β y análisis en un aparato Cyclone[™] “Storage Phosphor System” (Packard).

Tabla II.2. Secuencias de oligonucleótidos usados para la síntesis de las sondas radiactivas

Se señala el nombre de cada oligonucleótido, indicando la sonda que amplifica cada pareja, así como la longitud de la sonda resultante.

Sonda	Cebador	Secuencia	Amplicón
<i>OsNtrC(MNTR)</i>	OsNTRC 5' Fv	5'-CATCCTCTCCCTCTCCTCTA -3'	825 pb
	OsNTRC Sp Rv	5'-TGGCCTTTGGGATTGCT-3'	
<i>OsNtrC(MTrx)</i>	OsNTRC-QPCR Fw	5'- AGTTGCCAACGACCTTCTTG -3'	418 pb
	OsNTRC 3' Rv	5'-TCATTTGTTTGACTCGATAAAC-3'	

II.4.7. Preparación de cDNA por RT-PCR

La retrotranscripción (RT) del RNA total aislado se realizó con el Kit QuantiTect® (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Generalmente se retrotranscribió 1 µg de RNA total en un volumen de reacción de 20 µL.

Las muestras de RNA aisladas de endospermo fueron tratadas previamente a la retrotranscripción con DNAsa según las instrucciones del fabricante del kit *DNAfree* (Ambion), para reducir el DNA genómico contaminante hasta niveles indetectables por PCR.

II.4.8. RT-PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

Para la cuantificación absoluta de los niveles de mRNA se recurrió al análisis mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR). Se trata de una técnica que combina alta sensibilidad y especificidad (Czechowski et al., 2004). Esta técnica se basa fundamentalmente en la determinación del ciclo umbral (*Threshold Cycle*, Ct) de cada muestra, es decir, del número de ciclos a partir del cual la señal de fluorescencia es significativamente mayor que el ruido de fondo (Ginzinger, 2002). Los valores de Ct obtenidos son utilizados para calcular la abundancia del cDNA molde en cada muestra, ya que los valores de Ct son directamente proporcionales a la cantidad de cDNA inicial y son, por tanto, la base para calcular los niveles de mRNA (Ginzinger, 2002). Las reacciones de qPCR llevadas a cabo en este trabajo presentan una eficiencia de reacción entre 80 y 120%, parámetro determinante a la hora de proceder a una correcta cuantificación de las muestras. Cabe mencionar que la eficiencia de reacción está influenciada no sólo por el tipo de cebadores utilizados y producto amplificado, sino por las propias condiciones de la reacción (tiempo y temperatura de alineamiento, concentración de enzima y resto de reactivos). La eficiencia de las reacciones se calculaba de la siguiente manera: a partir de diluciones seriadas del DNA molde, se realizaban reacciones de qPCR y se determinaba el Ct de cada dilución. Después se representaba el Ct frente al logaritmo de la cantidad de DNA molde utilizado. La pendiente (*m*) de la recta obtenida determina la eficiencia (*n*) de la reacción en función de la siguiente ecuación: $n = [(10^{-1/m}) - 1] \times 100$.

Para cuantificar la expresión de los genes estudiados en este trabajo se han empleado sondas de la colección “*Universal Probe Library*” (Roche). La elección de las sondas y cebadores específicos para cada gen analizado se realizó a través del programa “*Probe Finder Software*”, disponible en la red: <https://qpcr1.probefinder.com>. Los oligonucleótidos y sondas utilizados se detallan en la Tabla II.3.

Tabla II.3. Secuencias de oligonucleótidos usados en experimentos de qPCR

Se señala el nombre de cada oligonucleótido, indicando el gen que amplifica cada pareja, así como el número de la sonda utilizada.

Gen	Cebador	Secuencia	Sonda
<i>OsNtrC</i>	OsNTRC-QPCR Fw	5'-AGTTGCCAACGACCTTCTTG-3'	#133
	OsNTRC-QPCR Rv	5'-CAAGCCCCATCTCGACCATCT-3'	
<i>Sus1</i>	OsSUS1 Fw	5'-CGATGAACCACGCTGACTT-3'	#9
	OsSUS1 Rv	5'-CATACTGACCAACAGTGTCTTGT-3'	
<i>Sus2</i>	OsSUS2 Fw	5'-TCCAAGAAATTGCTGGAAGC-3'	#43
	OsSUS2 Rv	5'-AAGGGTGAATGCAATGTGTG-3'	
<i>Sus3</i>	OsSUS3 Fw	5'-GACCCGTCTCCACAGCAT-3'	#5
	OsSUS3 Rv	5'-CATTCCTTTCTTGGTTCA-3'	
<i>OsUbi</i>	SA941	5'-GGGTTCACAAGTCTGCCTATTT-3'	#93
	RUBQIRv	5'-GCAAAACGTTTCAGACACCA-3'	
<i>TaNtrC</i>	TaNTRC-QPCR Fw	5'-CGAAGGCACAGCAAAAATT-3'	#9
	TaNTRC-QPCR Rv	5'-CTTGCCTCCATTCATGATCC-3'	
<i>RNA26S</i>	Ta26S-QPCR Fw	5'-TTCACGTGTGAACCGAAGTC-3'	#12
	Ta26S-QPCR Rv	5'-AGGCGAGGACTGAAATGAGA-3'	

La reacción de qPCR se llevaba a cabo en un volumen final de 25 μ L y contenía 5 μ L de cDNA, 0,5 μ L de cada cebador (de una solución stock 10 μ M), 0,125 μ L de sonda “*Universal Probe Library*”, 12,5 μ L de mezcla de reacción (SensiMix™, Bioline) y 1,5 μ L de una solución de MgCl₂ 50 mM. Las reacciones se realizaron en un termociclador iQ5 de Bio-Rad siguiendo el siguiente programa:

CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO
CICLO 1:		
Paso 1	94°C	3 min
CICLO 2: (40X)		
Paso 1	94°C	10 s
Paso 2	60°C	1 min
CICLO 3:		
Paso 1	72°C	5 min

Las muestras se analizaban por triplicado y la determinación de los niveles de mRNA de cada gen corresponde a la media de tres ensayos de qPCR de tres muestras de cDNA. Para la cuantificación absoluta de los transcritos se utilizó una recta patrón que consistía en diluciones seriadas de cantidades conocidas de DNA molde que contuviera el producto a amplificar. Los valores de Ct obtenidos se relacionaban con los obtenidos en la recta patrón, calculándose de esa forma el número de copias de cada transcrito. La cantidad de transcrito entre distintas

preparaciones de cDNA se relativizaba frente al número de copias del gen de expresión constitutiva *poliubiquitina* (*OsUbi*) en el caso del arroz o del RNA 26S en el caso del trigo. Los resultados se expresan como la razón del número de copias de mRNA del gen en estudio respecto al número de copias de mRNA de *OsUbi* y respecto al número de copias del RNA 26S en arroz y trigo, respectivamente.

II.4.9. Amplificación de los extremos del cDNA (RACE)

Para la clonación del cDNA completo de NTRC de endospermo de arroz se utilizó el sistema RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*). Esta técnica está basada en la amplificación, mediante PCR, de los extremos del mRNA a partir de una secuencia de cDNA conocida. Esta metodología permite amplificar tanto el extremo 5' como 3' del cDNA. En particular, en este trabajo se realizó la técnica RLM-RACE (*RNA Ligase Mediated Rapid Amplification of cDNA Ends*) diseñada para amplificar cDNA exclusivamente de mRNA intactos que conservan la caperuza 5' (Figura II.3).

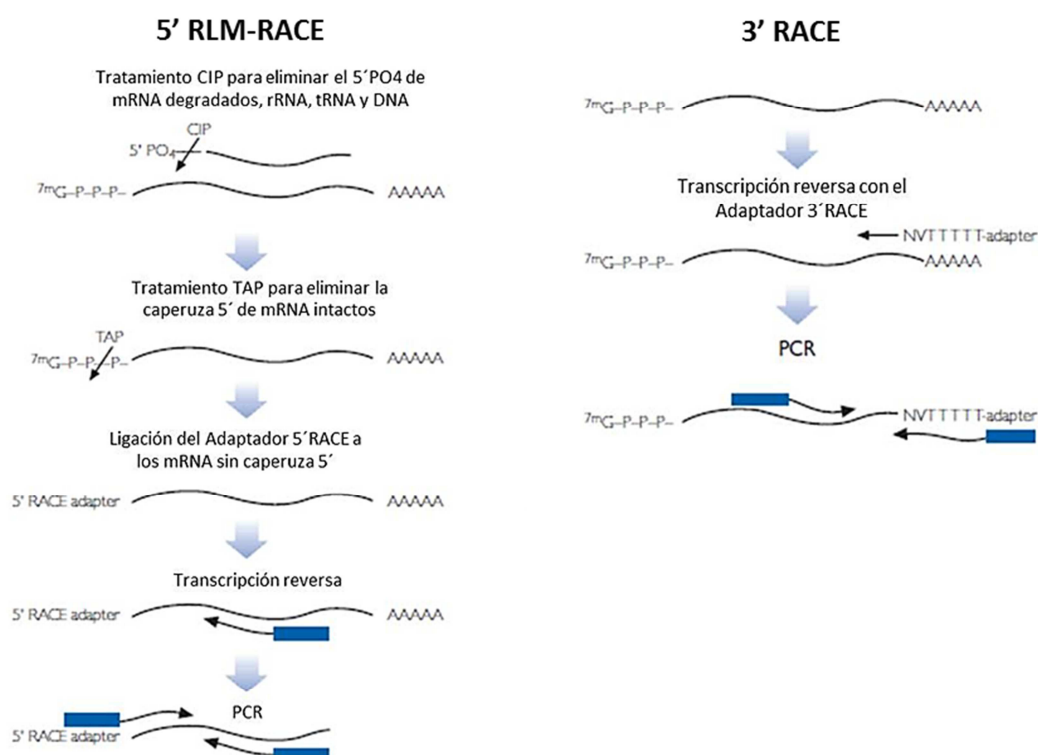


Figura II.3. Descripción general de la técnica RLM-RACE
Adaptado del manual Kit *FirstChoice®RLM-RACE* (Ambion).

En este trabajo la amplificación del cDNA completo de NTRC en endospermo se realizó utilizando el Kit *FirstChoice®RLM-RACE* (Ambion) siguiendo las instrucciones especificadas por el fabricante. Para tal fin se utilizó al menos 250 ng de RNA Poli(A)⁺ de partida y los cebadores

especificados en la Tabla II.4. Como control de las reacciones se utilizaba mRNA de tejido fotosintético, donde el cDNA completo de NTRC es conocido. Una vez realizadas las reacciones de amplificación, se realizaba una electroforesis en gel de agarosa para la visualización del amplificado. Posteriormente se purificaba el fragmento de DNA del gel y se clonaba en pGEMt para su posterior secuenciación.

Tabla II.4. Secuencias de oligonucleótidos usados en experimentos de RACE

Cebador	Secuencia
5' RACE Outer Primer*	5'-GCTGATGGCGATGAATGAACACTG-3'
5' RACE Inner Primer*	5'-CGCGGATCCGAACACTGCGTTTGCTGGCTTTGATG-3'
5' RACE Rv	5'- AAGTTCTCCACTCCCTTGCCA-3'
5' RACE Rv (2)	5'-AACGGTCTGCTCTTCACATT -3'
OsNTRC 5' Fw	5'-CATCCTCTCCCTCTCCTCTA -3'
3' RACE Outer Primer*	5'-GCGAGCACAGAATTAATACGACT-3'
3' RACE Inner Primer*	5'-CGCGGATCCGAATTAATACGACTCACTATAGG-3'
3' RACE Fw	5'-AATGCTCAGGACTGTCTCTGGT -3'

*Oligonucleótidos suministrados por el Kit *FirstChoice®RLM-RACE* (Ambion)

II.5. MÉTODOS DE EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

II.5.1. Expresión de proteínas en *E. coli*

Este sistema de sobreexpresión de proteínas en *E. coli* se utilizó para expresar proteínas recombinantes a partir de construcciones que se habían obtenido con anterioridad en nuestro laboratorio, así como las construcciones realizadas para la expresión de las isoformas 1, 2 y 3 de sacarosa sintasas de arroz (Tabla II.5).

Tabla II.5. Construcciones realizadas para la expresión de proteínas en *E. coli*

Se especifica el gen clonado y los oligonucleótidos utilizados. Subrayados se indican los sitios de restricción *Bam*HI (GGATCC) y *Hind*III (AAGCTT).

Gen	Cebadores	Secuencia	Vector/es resultante/s
<i>OsSUS1</i>	SUS1 <i>Bam</i> HI Fw	5'-GAGGATCCATGGGGGAAGCTGC-3'	pQE30- <i>Sus1</i>
	SUS1 <i>Hind</i> III Rv	5'-GAAAGCTTTCACTTGTTTCGACG-3'	
<i>OsSUS2</i>	SUS2 <i>Bam</i> HI Fw	5'-GAGGATCCATGGCTGCCAAGCT-3'	pQE30- <i>Sus2</i> ,
	SUS2-pt <i>Bam</i> HI Fw	5'-GAGGATCCCTCTTCTCTAGGTA-3'	pQE30- <i>Sus2pt</i>
	SUS2 <i>Hind</i> III Rv	5'-CTAAGCTTTTACTTGGATGTGC-3'	
<i>OsSUS3</i>	SUS3 <i>Bam</i> HI Fw	5'-GAGGATCCATGGGGGAAACTAC-3'	pQE30- <i>Sus3</i>
	SUS3 <i>Hind</i> III Rv	5'-GAAAGCTTTCATTTGGTGGAGG-3'	

Dichas construcciones se realizaron utilizando el vector de expresión pQE30 (Qiagen), que facilita la purificación de las proteínas recombinantes mediante la adición, en el extremo N-terminal, de una cola de seis His codificadas por la secuencia del vector.

Mediante este sistema se expresaron las proteínas recombinantes OsNTRC, OsNTRC C380S, OsNTRB y TaTrxhA y se trataron de expresar las proteínas OsSUS1, OsSUS2 y OsSUS3.

Con los plásmidos se transformaron las estirpes de *E. coli* XL1-Blue o BL21(DE3), según el caso. Para inducir la síntesis de las proteínas de fusión se cultivaba un preinóculo de *E. coli* transformado con la construcción correspondiente a 37°C, con agitación durante toda la noche, en medio LB suplementado con ampicilina y glucosa al 2% (p/v).

Con el preinóculo de *E. coli* XL1-Blue y BL21(DE3) se inoculaba medio LB suplementado con ampicilina con el volumen requerido de dicho preinóculo y se cultivaba a 37°C con agitación hasta alcanzar una $DO_{600} \approx 0,5$. A continuación se le añadía IPTG a una concentración final de 1 mM dejando el cultivo incubando generalmente otras 3 h a 37°C con agitación (el tiempo y la temperatura variaba según la proteína que se pretendía expresar). Tras este periodo las células se precipitaban por centrifugación (2.000 *xg*, 10 min, 4°C) y se almacenaban a -20°C hasta su utilización.

II.5.2. Obtención de extractos de *E. coli*

La obtención de extractos crudos de *E. coli* se llevó a cabo mediante dos métodos. En el primero de ellos, para pequeños volúmenes (6 mL del cultivo), se rompían las células con perlas de vidrio (425-600 μm de diámetro) en 200 μL de un tampón de extracción que contenía Tris-HCl 50 mM pH 7,9, EDTA 1 mM y PMSF 1 mM, agitando en un vórtex (4 ciclos de 30 s, y dejando 30 s en hielo entre cada pulso). A continuación, se centrifugaba el extracto crudo (15.000 *xg*, 20 min, 4°C) para separar el sobrenadante del precipitado de membranas y poder analizarlos de manera independiente. Los extractos se guardaron a -20°C. Este método se utilizó para las pruebas de expresión de las proteínas OsSUS1, OsSUS2 y OsSUS3. La rotura de volúmenes mayores (500-1000 mL de cultivo) se realizó por presión utilizando la prensa de French. Este método se llevó a cabo para la purificación de las proteínas OsNTRC, OsNTRC C380S, OsNTRB y TaTrxhA siguiendo el siguiente protocolo. Las células se resuspendían en tampón de extracción (5 mL/g de peso fresco) que contenía tampón fosfato 20 mM pH 7,4, NaCl 500 mM, glicerol al 10% (v/v) y PMSF 1 mM. A continuación las células se pasaron 3 veces por la prensa de French sometiendo a 6.000 psi. Posteriormente, las células se centrifugaron (15.000 *xg*, 20 min, 4°C) para separar la fracción soluble de la membranosa, guardándose a -20°C hasta el momento de la purificación.

II.5.3. Expresión transitoria de proteínas en hojas de *Nicotiana benthamiana*

El sistema de sobreexpresión de proteínas en *N. benthamiana* se utilizó para expresar proteínas recombinantes a partir de construcciones realizadas para la expresión de las isoformas 1, 2 y 3 de sacarosa sintasa de arroz (Tabla II.6).

Tabla II.6. Construcciones realizadas para la expresión de proteínas en *N. benthamiana*

Se especifica el gen clonado y los oligonucleótidos utilizados.

Gen	Cebadores	Secuencia	Vector/es resultante/s
<i>OsSUS1</i>	attB1 SUS1	5'-attB1-CAATGGGGGAAGCTGCCGCGAC-3'	pGWB8- <i>Sus1</i>
	attB2 SUS1	5'-attB2-ACTTGT CGACGGCTCGCCCTCG-3'	pGWB9- <i>Sus1</i>
<i>OsSUS2</i>	attB1 SUS2	5'-attB1-CAATGGCTGCCAAGCTAGCTCGC-3'	pGWB8- <i>Sus2</i>
	attB1 SUS2-pt	5'-attB1-CAATGCTCTTCTCTAGGTATGTT-3'	pGWB9- <i>Sus2</i>
	attB2 SUS2	5'-attB2-ACTTGGATGTGCTCTCTCCATC-3'	pGWB8- <i>Sus2pt</i> pGWB9- <i>Sus2pt</i>
<i>pOsSUS3</i>	attB1 SUS3	5'-attB1-CAATGGGGGAACTACTGGAGAA-3'	pGWB8- <i>Sus3</i>
	attB2 SUS3	5'-attB2-ATTTGGTGGAGGCCTCTCCCTCA-3'	pGWB9- <i>Sus3</i>

El procedimiento para la expresión transitoria de proteínas en hojas de *N. benthamiana* se realizó de acuerdo a la metodología ya descrita por He y colaboradores (He et al., 2004). El cultivo de *Agrobacterium* con el correspondiente gen de interés se cultivó en medio LB suplementado con kanamicina y rifampicina durante toda la noche a 30°C. Al día siguiente las células se recolectaron por centrifugación (5 min, 2.500 *xg*) y se lavaron dos veces con medio de inducción [MES 50 mM pH 5,6, glucosa 27 mM, NaH₂PO₄ 2mM, acetosiringona 0,2 mM y AB salts (NaH₄Cl 16 mM, MgSO₄ 7H₂O 1,25 mM, KCl 2 mM, CaCl₂ 0,05 mM, FeSO₄ 7H₂O 7,5 nM) al 5% (v/v)]. Tras la incubación durante 2 h a temperatura ambiente los cultivos se centrifugaron (5 min, 2.500 *xg*) y se resuspendieron en tampón MES 10 mM suplementado con 0,2 mM de acetosiringona dejándolos a una DO₆₀₀≈0,2. La infiltración en hojas de *N. benthamiana* se realizó mediante la realización de una pequeña incisión a través de la cual fueron inyectadas simultáneamente la cepa de *Agrobacterium*, que portaba la construcción para la expresión de la proteína de arroz, junto con la cepa de *Agrobacterium* que contenía el vector P19, que impide el silenciamiento de la expresión de la proteína recombinante por parte de la planta. Las hojas se recolectaron entre 3 y 6 días después de la infección dependiendo de la proteína expresada, se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta el momento de su utilización.

La extracción de proteínas de este material, triturado en mortero en nitrógeno líquido, se realizó con un tampón de extracción compuesto por HEPES/KOH 50 mM pH 7,0, sacarosa 150 mM, KCl 150 mM, DTT 5 mM, glicerol al 10% (v/v), PMSF 1 mM y una mezcla de inhibidores de proteasas (Sigma) al 5% (v/v). Tras mezclar bien con ayuda de un vórtex, el extracto se filtró a través de 3 capas de Miracloth (Calbiochem) previamente humedecido en tampón de extracción y se centrifugó a 16.000 xg durante 15 min a 4°C. El sobrenadante se mantenía en frío hasta el momento de su purificación.

II.5.4. Purificación de proteínas recombinantes

El método de purificación consistió en una cromatografía de afinidad por níquel. Se utilizaron dos metodologías diferentes según el caso:

- Purificación con columnas *HiTrap* (Pharmacia Biosciences) cargadas con Ni^{2+} en el sistema ÄKTAprime (Amersham) siguiendo las recomendaciones de los fabricantes. En este caso el tampón utilizado fue fosfato sódico 20 mM pH 7,4 suplementado con NaCl 0,5 M, imidazol 40 mM y glicerol al 10% (v/v). La elución de la proteína se realizaba mediante un gradiente de 0 a 500 mM de imidazol en el tampón fosfato.
- Purificación en *batch/gravity-flow* usando la resina *Ni-NTA Agarose* (Invitrogen) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. En este caso se utilizó un tampón compuesto por HEPES/KOH 50 mM pH 7,0, sacarosa 150 mM, KCl 150 mM, DTT 2 mM, glicerol al 10% (v/v) y tritón X-100 al 0,1% (v/v). La elución de las proteínas se realizaba con el tampón de purificación suplementado con 200 mM de Imidazol.

II.6. PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

II.6.1. Extractos totales de proteína

Para la obtención de los distintos extractos crudos, aproximadamente 0,5 g del material vegetal, previamente triturado y congelado, se homogeneizaba a 4°C con tampón de extracción [Tris-HCl 50 mM pH 7,9, MgCl_2 10 mM, EDTA 1 mM, glicerol 10% (v/v), una mezcla de inhibidores de proteasas (Sigma) al 5% (v/v)]. Para condiciones reductoras el tampón se suplementaba con 2-Mercaptoetanol 14 mM y DTT 10 mM. Tras centrifugar a 15.000 xg durante 20 min a 4°C, se recuperaba el sobrenadante, que contenía la fracción de proteínas solubles.

La extracción de proteínas del material vegetal para la realización de ensayos de actividad SUS se realizó según el protocolo descrito en Marino et al., 2008 con alguna modificación. El tejido triturado y congelado se homogeneizaba a 4°C con ácido 3-(n-morfolín)

propanosulfónico (MOPS) 50 mM pH 7,0, polivinil pirrolidona (PVP) al 3% (p/v), DTT 10 mM, β -Mercaptoetanol 10 mM, EDTA 1 mM, KCl 20 mM y $MgCl_2$ 5 mM, y se centrifugaba a 20.000 xg durante 30 min a 4°C.

II.6.2. Cuantificación de extractos proteicos

Los extractos de proteínas se cuantificaron por el método de Bradford con el reactivo comercial (BioRad) según las indicaciones del fabricante.

II.6.3. Precipitación de proteínas

La precipitación de proteínas se realizaba cuando se requería una preparación de mayor concentración. Este tipo de precipitación se realizaba con ácido tricloroacético (TCA) según el siguiente protocolo: se añadía a la muestra TCA a una concentración final de 5% (v/v) y se dejaba 30 min en hielo. Tras centrifugar durante 20 min a 16.000 xg a 4°C, se lavaba el *pellet* dos veces con 200 μ L de acetona fría al 100% centrifugando cada vez 20 min a 16.000 xg a 4°C. El *pellet* resultante se dejaba secar y se resuspendía en el tampón adecuado para su uso posterior.

Si se requería una precipitación fraccionada de las proteínas, por ejemplo en el caso de las inmunoglobulinas, o el enriquecimiento de una proteína en la preparación, se realizaba una precipitación con sulfato de amonio. Este método se llevaba a cabo mediante la adición a la muestra de la cantidad de sulfato de amonio sólido necesaria para conseguir la concentración final deseada. Una vez disuelto el sulfato de amonio por agitación, se centrifugaba durante 15 min a 20.000 xg a 4°C. El *pellet* resultante se resuspendía en PBS y se guardaba a -20°C hasta su uso.

II.6.4. Cromatografía en columnas

II.6.4.1. Filtración en gel

Este tipo de cromatografía se utilizó para la diálisis de proteínas y el intercambio de tampones. Se utilizaron dos tipos de columnas según se requería:

- A. Columnas HiTrap™ Desalting (Amersham). Este método requería la utilización del sistema ÄKTAprime (Amersham) y se realizaba siguiendo el programa predefinido por el fabricante.
- B. Columnas Zeba Desalting (Thermo scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante.

II.6.4.2. Cromatografía de afinidad

En este trabajo se utilizó la cromatografía de afinidad como herramienta para la detección de proteínas dianas de NTRC en endospermo. Este método se llevó a cabo en el sistema ÄKTAprime (Amersham) utilizando columnas HiTrap™ Chelating (Amersham) a las cuales se les unía, hasta la saturación, la proteína recombinante con 6 histidinas OsNTRC mutada en la cisteína 380 del sitio activo del módulo Trx (generada anteriormente en nuestro laboratorio (Perez-Ruiz et al., 2006)). Esta mutación en la proteína permite el establecimiento de un puente disulfuro con una cisteína oxidada de la proteína diana, pero es incapaz de resolver esta unión para regresar a su forma oxidada. De este modo, las proteínas diana de NTRC quedan covalentemente unidas a ella.

La metodología seguida se detalla a continuación. El primer paso consistía en cargar la columna con Ni^{2+} a partir de una solución de sulfato de níquel 100 mM con ayuda de una jeringa. Tras lavar la columna, se procedía a su saturación con una preparación de unos 8 mg de la proteína OsNTRC(C380S) previamente purificada (según apartado II.5.4) y dializada (según apartado II.6.4.1.A). Este paso se realizaba recirculando la proteína durante 2 h por la columna con ayuda de una bomba peristáltica a 4°C. A continuación, tras lavar la columna, se dejaba recircular durante toda la noche a 4°C un extracto de 6-8 mg de proteínas de endospermo (según apartado II.6.1 sin la presencia de agentes reductores en el tampón de extracción), de arroz o de trigo según el caso, previamente dializado (según apartado II.6.4.1.B) y eluido en tampón A. Finalizado este paso se procedía al montaje de la columna en el sistema ÄKTAprime y se seleccionaba un programa específicamente diseñado para este experimento. El programa comenzaba con un lavado y equilibrado de la columna con tampón fosfato sódico 20 mM, seguido de tres pasos sucesivos de elución de proteínas, cada uno de ellos realizado con un tampón de elución con diferentes propiedades:

1. Elución por intercambio iónico mediante un gradiente de 0 a 1 M de NaCl.
2. Elución por reducción con 150 mM β -Mercaptoetanol o con 10 mM TCEP.
3. Elución con imidazol mediante un gradiente de 0 a 500 mM de imidazol.

II.6.5. Electroforesis de proteínas

II.6.5.1. SDS-PAGE

La separación analítica de las proteínas se realizó por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), según el sistema discontinuo (Laemmli, 1970). El gel de separación se preparó en diferentes porcentajes de acrilamida (acrilamida:bis-acrilamida 29:1) con SDS al 0,1% (p/v) en tampón Tris-HCl 0,375 M pH 8,8. El gel de empaquetamiento, al 4% de acrilamida, contenía los mismos componentes excepto el tampón que era Tris-HCl 0,125 M pH 6,8. Los geles se polimerizaron con APS al 0,5 % (p/v) usando TEMED 6,6 mM como agente catalizador. Antes de cargar, las muestras se suplementaron con tampón de carga (4x, 1/4 del volumen total de la muestra) compuesto por Tris-HCl 62 mM pH 6,8, glicerol 10% (v/v), SDS 2% (p/v), azul de bromofenol 0,05% (p/v) en presencia o no de β -Mercaptoetanol 5% (v/v). En general, las muestras se trataron a 95°C durante 5 min.

Se utilizaron geles de dos tamaños diferentes. Los geles de 8x6 cm y 1,0 mm o 1,5 mm de grosor (geles pequeños) se dispusieron para la electroforesis en una cubeta Mini-Protean^R II-2D Cell (Bio-Rad), a voltaje constante (90-150 V, 1,5-3 h) a temperatura ambiente. Con geles de 16x18 cm (geles medianos) se utilizaron separadores de 1,0 mm o de 1,5 mm de grosor según el caso, disponiéndose en una cubeta SE 600 Ruby (GE Healthcare), con voltaje constante (70 V durante la noche ó 200 V, 5-6 h). Como tampón de electroforesis se utilizó, en ambos casos, una disolución que contenía Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glicina 0,19 M y SDS 0,1% (p/v).

II.6.5.2. Electroforesis bidimensional

Para realizar el isoelectroenfoco, las muestras se dispusieron en tampón de rehidratación (Bio-Rad). Si las muestras consistían en extractos totales de proteína, se procedió a precipitar con ácido tricloroacético (TCA) según apartado II.6.3.

Se emplearon, en función del pI de cada proteína, tiras de Bio-Rad de 11 cm IPG del rango de pH adecuado para cada caso. Las tiras se rehidrataron de forma pasiva con 200 μ L de tampón de rehidratación durante 12 h a 20°C. El isoelectroenfoco se realizó en el equipo *Protean IEF Cell* (Bio-Rad), según las indicaciones del fabricante.

Para la segunda dimensión, las tiras se dispusieron en tampón de equilibrado [Tris-HCl 375 mM pH 8,8, Urea 6 M, SDS 2% (p/v)] suplementado con DTT 2% (p/v) durante 10 min. Posteriormente se eliminó el DTT en exceso lavando con tampón de equilibrado suplementado

con iodoacetamida 135 mM durante 10 min. La segunda dimensión se realizó en gel de glicina de 16x18 cm como se describe en el apartado II.6.5.1, cubriendo la tira con agarosa 0,7%.

II.6.5.3. Marcadores de masa molecular para las electroforesis de proteínas

Los marcadores de masa molecular lo constituían diferentes proteínas preteñidas según los suministradores:

- *Broad range prestained standard* (Bio-Rad): miosina (210 kDa), β -galactosidasa (117 kDa), seroalbúmina bovina (98 kDa), ovoalbúmina (55 kDa), anhidrasa carbónica (37,5 kDa), inhibidor de tripsina (29 kDa), lisozima (20 kDa) y aprotinina (7 kDa).
- *AccuRuler RGB PLUS Prestained Protein Ladder* (Maestrogen).

II.6.6. Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida

Las proteínas se visualizaron rutinariamente mediante tinción con azul de *Coomassie*. Los geles se incubaron 30 min en agitación con solución de tinción de *Coomassie* [etanol 40% (v/v), ácido acético 10% (v/v) y azul *Coomassie* R-250 0,01% (p/v)]. Posteriormente se desteñían [etanol 40% (v/v) y ácido acético 10% (v/v)] en agitación.

En determinados casos, en los cuales se requería mayor sensibilidad o resolución se emplearon otros protocolos de tinción:

- *Biosafe™ Coomassie* (BioRad) según las indicaciones del fabricante.
- Tinción con *Coomassie* Coloidal (G-250). Esta tinción presenta algunas diferencias respecto a la tinción rutinaria con *Coomassie* R-250. Las proteínas en los geles se fijaban durante toda la noche con una solución compuesta por metanol 40% (v/v) y ácido acético 10% (v/v). Posteriormente se incubaban los geles durante 24 h, en agitación con una solución resultante de la mezcla de una solución A [ácido ortofosfórico 2% (p/v), sulfato de amonio 10% (p/v)] y de una solución B [azul de *Coomassie* G-250 5% (p/v)], a la que se añadía previamente $\frac{1}{4}$ de volumen de metanol. El desteñido se realizaba mediante lavados sucesivos con agua Mili-Q, hasta que las proteínas eran visibles.

II.6.7. Espectrofotometría de masas e identificación de proteínas

Una vez teñidas las proteínas, se procedía a la captación y extracción automática de las bandas de interés, con la ayuda del picador automático *EXQuest Spot cutter* (BioRad). Posteriormente, y de forma automatizada, las proteínas se sometían a un proceso de digestión triptica en una estación robotizada de Bruker para la digestión de proteínas en gel y el

procesamiento automatizado de las muestras para su análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF (Bruker Daltonics). El procesamiento de las muestras y su posterior análisis mediante espectrometría de masas MALDI-TOF estuvo a cargo del Servicio de Proteómica del Centro de Investigaciones Científicas Isla de la Cartuja.

Los criterios que se siguieron para identificar las proteínas analizadas se basan en la utilización de parámetros como las masas de péptidos obtenidos y su correspondencia con las masas de péptidos resultantes de digestiones teóricas de las proteínas presentes en las bases de datos (*peptides matched*), la probabilidad asociada a cada búsqueda (*score*) y el porcentaje de secuencia de la proteína candidata que cubren los péptidos que se han podido identificar (*sequence coverage*). Para que una identificación sea considerada fiable debe superar algunos umbrales: *score* ≥ 82 , *peptides matched* ≥ 3 y *sequence coverage* $\geq 25\%$.

II.7. MÉTODOS INMUNOLÓGICOS

II.7.1. Análisis mediante *Western blot*

Tras la electroforesis en gel de poliacrilamida, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Towbin et al., 1979). Previamente a la transferencia, los geles se sumergían en tampón TGM [Tris-HCl 48 mM, glicina 39 mM, SDS 0,037% (p/v) y metanol 20% (v/v)] durante 10 min. La transferencia de los péptidos a la membrana de nitrocelulosa (Millipore, poro 0,45 μm) se realizó utilizando tampón TGM en el sistema de transferencia semi-seco TE 77 PWR (Amersham Biosciences) con corriente constante (1 mA /cm²), durante 1 h y 30 min a un voltaje comprendido entre 10-15 V. Una vez finalizada la transferencia, las membranas se sometieron a los siguientes tratamientos:

1. Saturación. Mediante 2 incubaciones de 30 min en tampón TBS (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM) conteniendo leche en polvo desnatada al 5% (p/v) para saturar los sitios de unión no específicos.
2. Incubación con anticuerpos. Tras la saturación, la membrana se incubó durante 12-16 h, a 4°C con agitación, en tampón TBS que contenía anticuerpos con la dilución adecuada (1:750 para anti-NTRC, 1:1.500 anti-NTRB, 1:1.000 anti-SUS y 1:1.000 anti-polihistidina).
3. Primer lavado. Los anticuerpos unidos inespecíficamente a la membrana se eliminaron mediante dos lavados de 30 min en tampón TBS con Tween-20 al 0,1% (v/v).
4. Incubación con anticuerpo secundario. Se trata de una incubación con suero de cabra que contiene anti-inmunoglobulinas de conejo (en el caso de anti-NTRC, anti-NTRB y anti-SUS) o de ratón (en el caso de anti-polihistidina) marcadas con fosfatasa alcalina (Sigma) o

Peroxidasa de rábano (BioRad). Esta incubación se realizó durante 1 h, en agitación, en tampón TBS conteniendo una dilución 1:20.000 de anti-inmunoglobulinas.

5. Segundo lavado. La membrana se lavó de nuevo 2 veces durante 30 min en tampón TBS conteniendo Tween-20 al 0,1% (v/v).
6. Tercer lavado. Los restos de detergente se eliminaron lavando la membrana durante 10 min en tampón TBS.
7. Revelado. Dependiendo del marcaje del anticuerpo secundario se procedía a revelar la membrana siguiendo los siguientes protocolos.
 - a. Revelado de la actividad fosfatasa alcalina. La reacción se visualizó por inmersión de la membrana en solución de revelado [Tris-HCl 100 mM pH 9,5, MgCl₂ 5 mM, NaCl 100 mM, 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) 150 mg/L y nitroblue tetrazolium (NBT) 300 mg/L]. La reacción de revelado se paraba introduciendo la membrana en agua destilada.
 - b. Revelado por quimiofluorescencia. Para el revelado de la actividad Peroxidasa se utilizó el conjunto de reactivos *Immobilon Western* (Millipore) siguiendo las indicaciones del fabricante.

II.7.2. Inmunolocalización

Las semillas de trigo en germinación o en distintos estadíos de desarrollo analizadas se fijaron en formaldehído al 4% y, tras ser deshidratados en una serie alcohólica creciente, se embebieron en Paraplast Plus (Sigma), según se describe en Cejudo et al. (1992). Los bloques de este material se cortaron en secciones de 10 µm y se dispusieron sobre portaobjetos cubiertos por una fina película de poli-L-lisina para permitir la fijación del material vegetal.

Para retirar la cera, las secciones se incubaron en xilol (3x10 min), se sometieron a rehidratación mediante tratamientos con etanol absoluto (2x1 min); y 1 min con una serie decreciente de etanol (95%, 85%, 50%, 30%) preparada con TBS y finalmente TBS, 2 min. Posteriormente se llevó a cabo el bloqueo de los sitios de unión inespecíficos tratando los tejidos 2-3 h en TBS conteniendo seroalbúmina bovina (BSA) al 1% (p/v). A continuación se procedió a la incubación con anticuerpos, para lo cual se cubrieron los tejidos del portaobjetos con una dilución 1:1.000 del anticuerpo en 100 µL de TBS, se cubrieron con el cubreobjetos y se incubaron 12 h a 4°C en un recipiente humedecido con TBS. Las secciones de tejidos se incubaron a continuación con suero de cabra anti-inmunoglobulinas de conejo marcado con fosfatasa alcalina (Sigma) durante 2 h a 37°C y, tras un segundo lavado, se procedió al revelado de la actividad fosfatasa alcalina. Para ello se mezclaron, en el momento de revelar, 45 mL de

tampón Tris-HCl 200 mM pH 9,5, MgCl_2 10 mM, con una disolución de 17 mg de NBT (Sigma) en 5 mL del mismo tampón, y una disolución de 7 mg de BCIP (Sigma) en 1 mL de agua destilada. La reacción colorimétrica que se desarrolló durante tiempos de 5 a 15 min y finalizó al introducir las secciones en tampón TE.

II.7.3. Purificación de anticuerpos

II.7.3.1. Purificación de anticuerpos en Proteína A

La purificación de anticuerpos del suero inmune se llevó a cabo mediante la utilización de una columna de Proteína A sepharosa CL-4B (Pharmacia), capaz de unir específicamente las inmunoglobulinas separándolas del resto de proteínas presentes en el suero.

El primer paso consistía en la preparación y empaquetamiento de la columna a partir de 1 g de proteína A sepharosa, hidratándola y lavándola primero con agua destilada para luego equilibrarla con tampón fosfato sódico (PBS) cuya composición era tampón fosfato sódico 25 mM pH 7,5 y NaCl 150 mM. Todos los pasos a través de la columna se han realizado por gravedad. Una vez preparada la columna se cargaba 1,5 mL del suero, utilizando como fase móvil PBS, volviendo a cargar en la columna todo el volumen eluido para aumentar la retención de anticuerpo. A continuación se lava la columna con PBS hasta que la OD_{280} del eluido era 0. En ese momento se procedía a la elución de los anticuerpos retenidos en la columna con 4 mL de tampón citrato sódico 0,2 M pH 2,8, que se recogía en tubos conteniendo 1,5 mL de Tris-HCl 1M pH 8,8 para neutralizar el pH del citrato. Este paso se repetía 6 veces para asegurar la recuperación de todo el anticuerpo.

Las diferentes fracciones obtenidas se precipitaban con sulfato de amonio (50%) según apartado II.6.3 y se resuspendía en 1 mL de PBS.

II.7.3.2. Purificación del anticuerpo anti-NTRC en columnas NHS

Cuando se requería una preparación de anticuerpo anti-NTRC de mayor pureza se procedía a la purificación del anticuerpo por cromatografía de afinidad utilizando una columna HiTrap NHS-activated (Pharmacia). Este método permite la inmovilización específica del anticuerpo mediante la unión covalente de su antígeno a la columna. El protocolo seguido fue el recomendado por la casa comercial y consta básicamente de 3 partes: unión del antígeno a la columna (en este caso el antígeno es la proteína recombinante NTRC de arroz purificada como se ha descrito en el apartado II.5.4 y dializada en PBS según apartado II.6.4.1.A), adsorción del anticuerpo policlonal de interés (anti-NTRC previamente purificado en proteína

A sepharosa según el apartado II.7.3.1) y elución del anticuerpo purificado (con una solución a pH ácido). Todo el proceso se realizaba con ayuda de una bomba peristáltica.

II.7.4. Inmunoprecipitación

Para la inmunoprecipitación de NTRC de semillas de arroz se preparó un extracto crudo de endospermo a partir de 500 mg de semillas, desprovistas del pericarpo, en tampón de extracción [Tris-HCl 50 mM pH 7,9, NaCl 150 mM, MgCl₂ 10 mM, PMSF 1 mM, NP-40 0,1 % (v/v) y una mezcla de inhibidores de proteasas (Sigma) al 5% (v/v)]. Tras centrifugar a 15.000 *xg* durante 20 min a 4°C, se recuperaba el sobrenadante, que contenía la fracción de proteínas solubles.

Por otro lado se preparaba la reacción de unión del anticuerpo a la proteína A siguiendo el protocolo que se describe a continuación. Se equilibraban 100 µL de perlas de proteína A Sepharosa 4B (Sigma) en PBS mediante lavados sucesivos, centrifugando entre cada lavado a 800 *xg* durante 5 min. A continuación se incubaban las perlas con 200 µg del anticuerpo purificado (según apartado II.7.3) durante 2 h a temperatura ambiente. Tras dos lavados con borato de sodio (bórax) 0,2 M en PBS, el complejo proteína A – Anticuerpo formado se fijaba incubando en agitación suave durante 30 min a temperatura ambiente en la solución bórax suplementada con dimetil pimelimidato (DMP) 40 mM. Posteriormente se incubaba con etanolamina 0,2 M durante 2 h en agitación suave a temperatura ambiente para detener la reacción de unión. Finalmente se equilibraba la mezcla en PBS.

Una vez preparado el complejo proteína A – anticuerpo se mezclaba con el extracto crudo de endospermo previamente descrito (1 mg de proteína total) y se incubaba a 4°C en agitación suave durante toda la noche. Tras varios lavados con tampón de extracción se realizaban dos eluciones sucesivas de las proteínas resuspendiendo la mezcla en 100 µL de tampón de carga 4x e incubando 4 min a 95°C. Finalmente se centrifugaba a 800 *xg* durante 5 min quedando en el sobrenadante las proteínas de interés.

II.8. ENSAYOS ENZIMÁTICOS

II.8.1. Determinación de la actividad Sacarosa Sintasa

La reacción catalizada por la sacarosa sintasa es reversible:



En este trabajo la actividad Sacarosa Sintasa se determinó para ambas direcciones midiendo tanto la aparición como la desaparición de UDP y UDPG por HPLC. Según la dirección de la reacción que se quería estudiar, la mezcla de reacción contenía:

Rotura de Sacarosa	Síntesis de Sacarosa
HEPES/KOH 50 mM pH 7,0*	HEPES/KOH 50 mM pH 8,0
EDTA 1 mM	EDTA 1 mM
Sacarosa 200 mM	Fructosa 10 mM
UDP 2 mM	UDP-glucosa 2 mM

*Para la reacción a pH 6,5 se utilizó MES/KOH 50 mM

A la mezcla de reacción se le adicionaba la proteína recombinante purificada (según apartado II.5.4) o el extracto crudo (según apartado II.6.1) dializados (según apartado II.6.4.1.B) en el tampón adecuado a la dirección de reacción y se incubaba durante 3 min a 37°C. La reacción se paraba hirviendo la muestra durante 2 min a 95°C. Para cada ensayo se tomaba una muestra a 0 min como blanco de la reacción.

La cantidad de UDP o UDPG sintetizada en el ensayo se determinaba mediante HPLC por el servicio de cromatografía del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis utilizando una columna Partisil 10 SAX (Whatman) de intercambio aniónico. Tanto el UDP como la UDPG formada en cada muestra se cuantificaban por comparación del área de los picos de absorción a 254 nm con los de las respectivas rectas patrones de cantidades conocidas de UDP y UDPG comerciales (Sigma). Este método permite a su vez la detección y cuantificación de otros nucleósidos difosfato como es el ADP y la ADPG, diferenciándolos del UDP y UDPG, respectivamente.

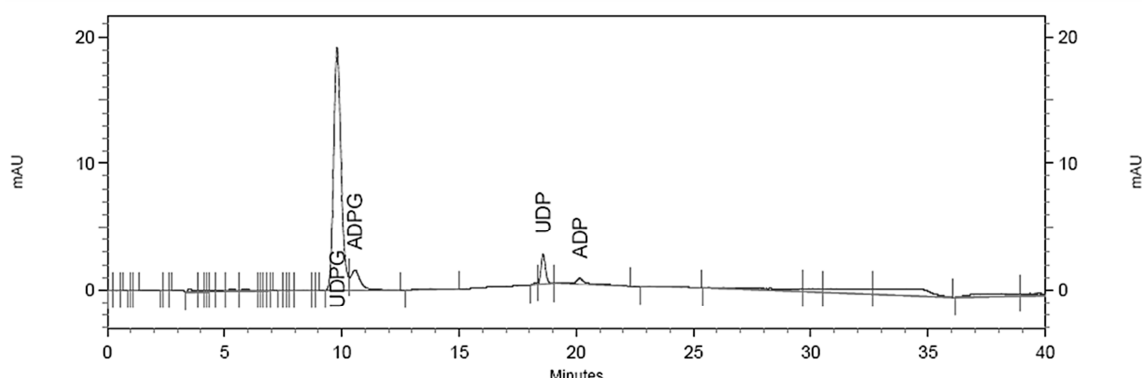


Figura II.4. Cromatograma de separación y cuantificación de UDP, UDPG, ADP y ADPG obtenido en HPLC

La actividad SUS según el estado redox de la proteína se llevó a cabo mediante un tratamiento de reducción con DTT 10 mM o de oxidación con H₂O₂ 5-10 mM.

II.9. HERRAMIENTAS DE BIOINFORMÁTICA

Para el procesamiento de los resultados se han empleado distintos programas informáticos. *Quantity One* (Bio-Rad) se usó para analizar y cuantificar geles de agarosa así como geles de poliacrilamida. Los programas *Microsoft Office PowerPoint* y *Adobe Photoshop* se utilizaron en la edición de imágenes y la construcción de las figuras. Con el programa *IQ5* v.2.0 (Bio-Rad) se analizaron los resultados de PCR. La purificación de proteínas mediante cromatografía de afinidad fue monitorizada mediante *Prime View* v.5.0 (Amersham).

La búsqueda de secuencias se hizo a través de la base de datos de la página web del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), o de la base de datos del *National Institute of Agrobiological Sciences* (NIAS) (<http://www.dna.affrc.go.jp/>), ambas disponibles a través de Internet. Para la búsqueda de similitud de secuencias se utilizó el algoritmo BLAST, accesible en las bases de datos.

En el diseño de oligonucleótidos se usó el programa *OligoAnalyzer* v.3.1 (*Integrated DNA Technologies*), excepto para el diseño de oligonucleótidos para RT-PCR cuantitativa que se realizó a través del programa “*Probe Finder Software*” (<https://qpcr1.probefinder.com>) utilizado también en la elección de las sondas. Para determinar dianas de endonucleasas de restricción se utilizó el programa *NEBcutter* v.2.0 (Vincze et al., 2003) y para otros análisis como traducción de secuencias de nucleótidos a aminoácidos y la conversión de secuencias complementarias reversas se emplearon programas disponibles en la dirección <http://www.us.expasy.org>.

La predicción de la localización subcelular de las proteínas se hizo con los programas *SignalP* v. 3.0 y *ChloroP* v.1.1 (Emanuelsson et al., 1999).

El alineamiento múltiple de secuencias se realizó con el programa *Clustalw2* v.2.0 (Larkin et al., 2007) disponible en el servidor del Instituto Europeo de Bioinformática (EBI) (<http://www.ebi.ac.uk>). Los alineamientos se procesaron con el programa **BioEdit** v.7.1.3.0 (Hall 1999) y los árboles filogenéticos con **TreeView** v.3.2.

III. RESULTADOS

III.1. ESTUDIO DE NTRC EN ENDOSPERMO DE SEMILLAS DE CEREALES

Aunque inicialmente se consideró que NTRC era exclusiva de cloroplastos, trabajos realizados por nuestro grupo han puesto de manifiesto su expresión tanto en tejidos fotosintéticos como no fotosintéticos y la localización de la proteína en cualquier tipo de plástido en *Arabidopsis* (Kirchsteiger et al., 2012). Estos resultados abren la posibilidad de que NTRC pudiese estar presente en plastos de tejidos de almacenamiento de almidón como son los amiloplastos de endospermo de semillas de cereales donde pudiera llevar a cabo funciones relacionadas con la regulación redox del metabolismo del carbono y en particular de la biosíntesis de almidón. En este trabajo hemos estudiado la presencia de NTRC en endospermo de semillas de cereales, así como su patrón de expresión, su posible localización y el papel que estaría desempeñando en este importante tejido de reserva.

III.1.1. Patrón de expresión de NTRC en endospermo

Las secuencias genómicas de organismos fotosintéticos que se han hecho públicas desde la identificación de NTRC en 2004 (Serrato et al., 2004) confirman la presencia de esta enzima en plantas, algas y algunas cianobacterias. A pesar de que NTRC fue inicialmente descubierta como consecuencia del análisis de la familia génica de los genes NTR de arroz, la mayor parte de los trabajos de expresión y caracterización de NTRC se han llevado a cabo en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Uno de los objetivos de este trabajo ha sido el de completar nuestro conocimiento de la expresión y la posible función de NTRC en otro tipo de plantas y, más concretamente, en tejidos como el endospermo de semillas de cereales, de gran importancia agronómica. Como paso previo hemos realizado un estudio filogenético de las secuencias de NTRC disponibles.

La comparación de secuencias de NTRC de diferentes organismos muestra entre ellas una identidad entre el 70% y el 90%, compartiendo una similitud superior al 60% con algas y cianobacterias como *Chlamydomonas reinhardtii* y *Anabaena variabilis* (Figura III.1.1). El análisis filogenético muestra que las NTRCs de plantas conforman un grupo bien diferenciado con respecto a las de otros organismos fotosintéticos. Dentro de este grupo se observa que los cereales, como plantas monocotiledóneas, conforman a su vez un subgrupo diferenciado del de dicotiledóneas (Figura III.1.2).

78

Brachypodium distachyon 1
Hordeum vulgare 57
Oryza sativa 59
Zea mays 65
Vitis vinifera 62
Ricinus communis 75
Medicago truncatula 76
Arabidopsis thaliana 71
Anabaena variabilis 71
Chlamydomonas reinhardtii 70
Clustal Consensus

Brachypodium distachyon 145
Hordeum vulgare 139
Oryza sativa 143
Zea mays 145
Vitis vinifera 151
Ricinus communis 146
Medicago truncatula 134
Arabidopsis thaliana 151
Anabaena variabilis 148
Chlamydomonas reinhardtii 74
Clustal Consensus

Brachypodium distachyon 225
Hordeum vulgare 219
Oryza sativa 217
Zea mays 225
Vitis vinifera 231
Ricinus communis 224
Medicago truncatula 216
Arabidopsis thaliana 231
Anabaena variabilis 154
Chlamydomonas reinhardtii 228
Clustal Consensus

Brachypodium distachyon 305
Hordeum vulgare 299
Oryza sativa 297
Zea mays 305
Vitis vinifera 311
Ricinus communis 304
Medicago truncatula 296
Arabidopsis thaliana 311
Anabaena variabilis 302
Chlamydomonas reinhardtii 306
Clustal Consensus

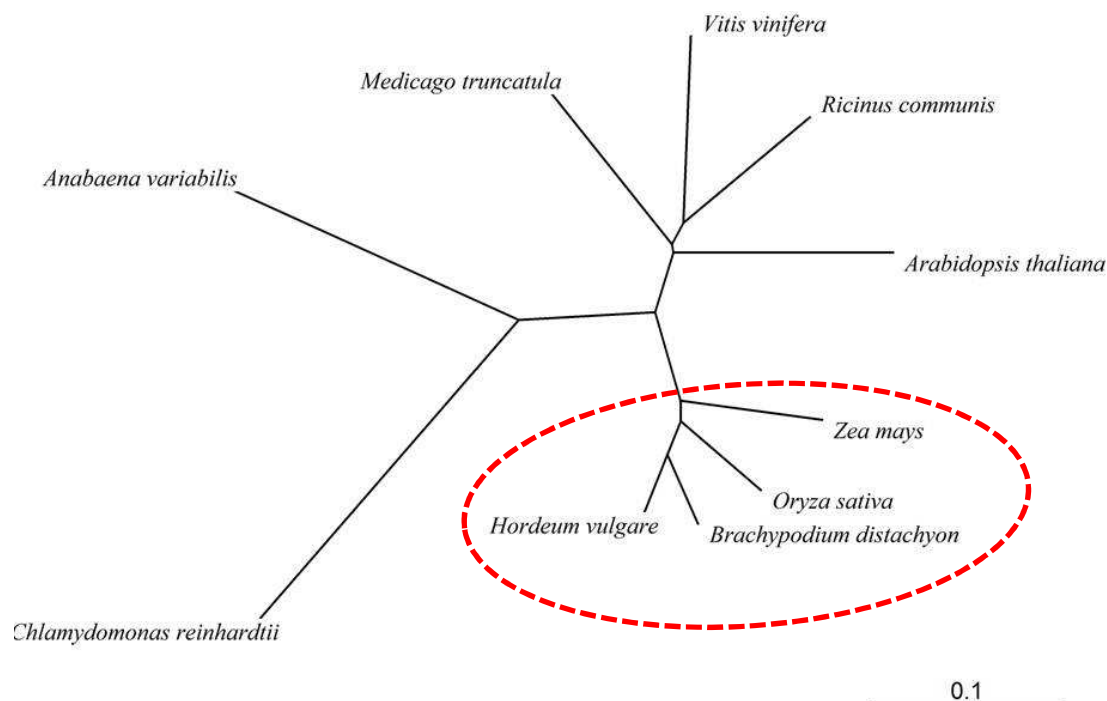
Brachypodium distachyon 385
Hordeum vulgare 379
Oryza sativa 377
Zea mays 385
Vitis vinifera 391
Ricinus communis 384
Medicago truncatula 376
Arabidopsis thaliana 391
Anabaena variabilis 382
Chlamydomonas reinhardtii 315
Clustal Consensus

Brachypodium distachyon 459
Hordeum vulgare 453
Oryza sativa 451
Zea mays 459
Vitis vinifera 465
Ricinus communis 458
Medicago truncatula 450
Arabidopsis thaliana 465
Anabaena variabilis 392
Chlamydomonas reinhardtii 447
Clustal Consensus

Brachypodium distachyon 523
Hordeum vulgare 517
Oryza sativa 515
Zea mays 523
Vitis vinifera 529
Ricinus communis 504
Medicago truncatula 514
Arabidopsis thaliana 529
Anabaena variabilis 456
Chlamydomonas reinhardtii 517
Clustal Consensus

Figura III.1.1. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de NTRC de diferentes organismos

El alineamiento de las secuencias aminoacídicas se realizó mediante CLUSTALW utilizando el programa BioEdit. Los números de acceso son los siguientes: *Brachypodium distachyon*, XP_003562531.1; *Hordeum vulgare*, BAJ89765.1; *Oryza sativa*, Q70G58.2; *Zea mays*, NP_001136660.1; *Vitis vinifera*, XP_002278551.1; *Ricinus communis*, XP_002529513.1; *Medicago truncatula*, ABH10139.1; *Arabidopsis thaliana*, NP_565954.1; *Anabaena variabilis*, YP_325129.1; *Chlamydomonas reinhardtii*, XP_001689807.1. Las cisteínas conservadas se han resaltado en amarillo y se señalan con un triángulo azul las pertenecientes a los sitios activos, a su vez marcados con un recuadro azul.

**Figura III.1.2. Árbol filogenético de NTRC de diferentes organismos**

El árbol filogenético se construyó a partir de secuencias de aminoácidos completas mediante CLUSTALW utilizando el programa TreeView. Los números de acceso son los siguientes: *Brachypodium distachyon*, XP_003562531.1; *Hordeum vulgare*, BAJ89765.1; *Oryza sativa*, Q70G58.2; *Zea mays*, NP_001136660.1; *Vitis vinifera*, XP_002278551.1; *Ricinus communis*, XP_002529513.1; *Medicago truncatula*, ABH10139.1; *Arabidopsis thaliana*, NP_565954.1; *Anabaena variabilis*, YP_325129.1; *Chlamydomonas reinhardtii*, XP_001689807.1. En rojo se resalta la rama que agrupa las NTRC de cereales.

III.1.1.1. Patrón de expresión de NTRC en arroz (*Oryza sativa*)

La disponibilidad de la secuencia genómica completa del arroz permitió establecer que NTRC está codificada en esta planta por un gen de copia única (Os07g0657900) y facilitó el diseño de oligonucleótidos para el análisis de su expresión en semillas. A partir de la secuencia completa del cDNA que codifica NTRC descrita en tejidos fotosintéticos y utilizando el programa "Probe Finder Software" se eligieron los cebadores y la sonda específicos para la cuantificación de la expresión del mRNA mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) (Figura III.1.3). Del mismo modo, se escogieron los cebadores y la sonda específica para el gen codificante de la *poliubiquitina* de arroz (*OsUbi*) de expresión constitutiva, que se utilizó como control endógeno de la expresión.

III. RESULTADOS

```

1   CCATCCTCTCCCTCTCTCTACTCCACACCTCCGCTTCTCCACTCCTCCCTCGCGATGGCGGTACGCGCCTCGCCGTGGCCGCGGCC 90
    M A V T R L A V A A A
91  TCTCGGCCAAGGCGTTGCGCGGTGCGCTGCCCCCGCGTGCACGAGGAGGCCCCCGCATCCCCGCTCCATCAGATCTTGGCAAGGGAG 180
    L S A K A L R A S A A P A V D E E A P A S P P P S D L G K G
181 TGGAGAACTTGGTGATCATAGGCTCTGGCCCGGCGGGGTACACTGCCGCGATTACGCCGCTCGGGCGAACCTCAAGCCCGTCGTGTTG 270
    V E N L V I I G S G P A G Y T A A I Y A A R A N L K P V V F
271 AAGGCTACCAGGTTGGTGGCGTTCTGGTGGGACGTGATGACCACACCGAGGTGGAGAATTTCCCTGGGTTTCGGGATGGCGTCACTG 360
    E G Y Q V G G V P G G Q L M T T T E V E N F P G F P D G V T
361 GGCCTGATCTCATGGACAAATGCGGAAGCAAGCGGAGCGGTGGGGTGTGAGCTTCACCAGGAGGATGTTGAGTTTGTGAATGTGAAGA 450
    G P D L M D K M R K Q A E R W G A E L H Q E D V E F V N V K
451 GCAGACCGTTTGTATTCTGTAGCAGTGATCTGAGGTGAAATGCCATAGTGAATCATTGCTACTGGTGTGTGTAAGCGCCTTCGAT 540
    S R P F V I R S S D R E V K C H S V I I A T G A A A K R L R
541 TACCTCGTGAAGATGAATTTTGGAGTAGAGGTATCAGTGCATGTGCAATATGTGATGGAGCATCCCCACTATTTAAGGGTCAAGTTCTTG 630
    L P R E D E F W S R G I S A C A I C D G A S P L F K G Q V L
631 CAGTTGTTGGAGGTGGTGATACAGCTACAGAGGAAGCTATATATTGACCAATATGCACGTACGTTTACTTTGTTGCGAAGGATC 720
    A V V G G G D T A T E E A I Y L T K Y A R H V H L L V R K D
721 AGCTACGAGCATCCAAAGCTATGCAGGACCGAGTACTCAACAATCCCAACATAACAGTACATTTCAATACAGAAGCTGTGGATGTTGTC 810
    Q L R A S K A M Q D R V L N N P N I T V H F N T E A V D V V
811 GCAATCCCAAGGCCAGATGTCTGGTATTCAACTGAAGAGAACCACACGGGAGAGGAATCAGTTCTTGAGGTGAAAGGTCTATTCTATG 900
    S N P K G Q M S G I Q L K R T D T G E E S V L E V K G L F Y
901 GCATAGGACACACTCCAAACAGTCAGTTGTTACAAGGTCAAATTGATCTTGACGATGCTGGTTATATTTTGGTTGAAGAAGGCACAGCAA 990
    G I G H T P N S Q L L Q G Q I D L D D A G Y I L V E E G T A
991 AAACATCAGTTGATGGTGTATTGCTGCTGGTGATGTGCAGGATCATGAATGGAGGCAAGCCGTTACTGCAGCTGGATCCGGATGTGTAG 1080
    K T S V D G V F A A G D V Q D H E W R Q A V T A A G S G C V
1081 CCGCTTGTGCGTGGAAGATACTTAGTTGCCAACGACCTTCTTGTGAATTCACACAGCCTGTTGCGGAAGAAAAGGAGAAGGAGATTA 1170
    A A L S V E R Y L V A N D L L V E F H Q P V R E E K E K E I
1171 CAGATAGAGATGTCGAGATGGGCTTTGACATTTCTCACACAAAGCATAGGGGACAGTATGCACTCCGCAAAGTATATCATGAAAGTCCAA 1260
    T D R D V E M G F D I S H T K H R G Q Y A L R K V Y H E S P
1261 GGCTTGTCTGTGTTCTATATACTTCTCCAACATGTGGTCTTGCAGAACCTTAAAGCCAATTCTAAGCAAGGTTATAGATGAGTACAACG 1350
    R L V C V L Y T S P T C G P C R T L K P I L S K V I D E Y N
1351 AACACGTTCAATTTGTGCGAAATTGACATCGAGGAGGATCCTGAAATAGCAGAAGCTGCAGGCATCATGGGAACACCATGTGTTCAATTT 1440
    E H V H F V E I D I E E D P E I A E A A G I M G T P C V Q F
1441 TTAATAAATAAGAAATGCTCAGGACTGTCTCTGGTGTAAAAATGAAGAAGGAATATAGGGAGTTTATCGAGTCAAACAAATGAGCTGAAC 1530
    F K N K E M L R T V S G V K M K K E Y R E F I E S N K *
1531 CCAACATACGATTCAAATTTTAAAGTGAATAGTCTTCTTTTGCCTACTGACTATTTCTAGCTGCCACCGTGGTGGCCAATTTTGGT 1620
1621 CAAAAATTTTCAGATGGGCGGGGTAGTGGGTTCAGAGGAAATTAGCCGGTCGCTCCTATT 1684

```

Figura III.1.3. Secuencia de cDNA del gen *NtrC* de arroz y su traducción a proteína

Secuencia completa del cDNA de NTRC de arroz (número de acceso GenBank AJ582621.1) y su traducción a proteína, resaltando en verde los residuos correspondientes al posible péptido de tránsito al cloroplasto, en rojo los residuos pertenecientes al módulo NTR de la proteína y en amarillo los correspondientes al módulo Trx. Las cisteínas de los sitios activos de cada módulo aparecen marcadas con un asterisco azul. Los oligonucleótidos *OsNTRC-QPCR Fw* y *OsNTRC-QPCR Rv* se utilizaron para la cuantificación de transcritos del gen mediante qPCR. El sitio de unión de la sonda aparece subrayado en gris. El triángulo negro indica la localización de una secuencia intrónica en el DNA genómico.

El estudio de la expresión del gen *NtrC* en semillas de arroz se realizó a partir de muestras de RNA total procedentes de semillas en las diferentes fases del desarrollo definidas previamente (Materiales y métodos). En la Figura III.1.4 se representan los niveles de mRNA del gen *NtrC* normalizados respecto a los niveles de transcrito del gen de la *poliubiquitina*. Además se analizó el contenido de la proteína NTRC mediante *Western blot* (Figura III.1.4 B). Los resultados obtenidos muestran la expresión del gen *OsNtrC* en endospermo en niveles similares, siempre inferiores a los obtenidos en hoja, durante todo el desarrollo de la semilla.

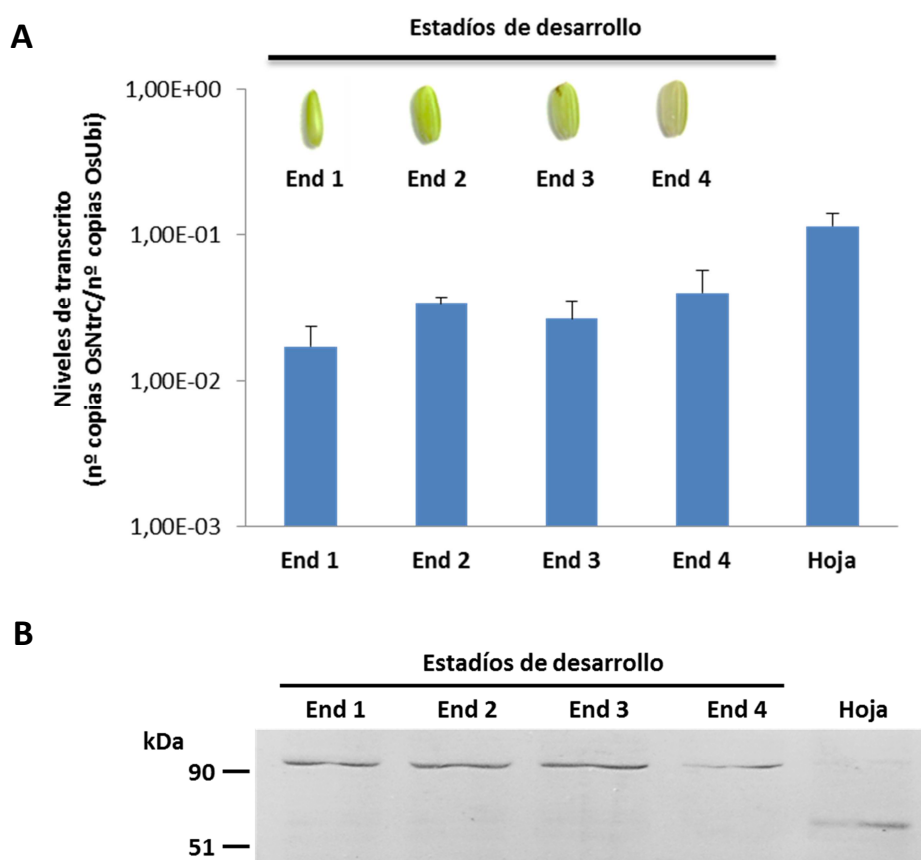


Figura III.1.4. Expresión de *OsNTRC* durante el desarrollo de semillas de arroz

(A) Se determinaron mediante qPCR los niveles de mRNA del gen *OsNtrC* en semillas de arroz en cada uno de los estadios de desarrollo establecidos (**End1 a End4**) y de hojas de planta adulta. En cada caso se utilizaron 50 ng del cDNA sintetizado a partir del RNA total aislado en las diferentes muestras. Los resultados se muestran en relación a los niveles de mRNA de la poliubiquitina (*OsUbi*) en cada muestra. (B) Análisis de la presencia de NTRC en las diferentes muestras mediante *Western blot* con un anticuerpo anti-NTRC. Se utilizaron extractos totales de proteínas de endospermo de semillas de arroz en cada estadio de desarrollo (50 µg de proteína) y de hoja (30 µg de proteína) en condiciones reductoras (tampones de extracción y de carga suplementados con βME 14 mM y DTT 10 mM). Los marcadores de peso molecular, en kDa, se indican a la izquierda.

El análisis *Western blot* mostró la presencia de NTRC en este tejido, si bien la proteína reconocida tenía una movilidad electroforética notablemente inferior a la de hoja. Frente a los 52 kDa que presenta NTRC en tejidos fotosintéticos, de acuerdo con el tamaño de la proteína resultante del cDNA identificado en arroz para NTRC, la proteína identificada en endospermo tenía un tamaño aproximado de 90 kDa. Dado que NTRC está codificada en arroz por un gen de copia única, una posibilidad para explicar el mayor tamaño de la proteína identificada en endospermo es que se produzca por un fenómeno de *splicing* alternativo no descrito hasta el momento.

III.1.1.2. Expresión de NTRC en trigo (*Triticum aestivum*)

Como un paso previo al estudio de la expresión de NTRC en semillas de trigo, fue necesario establecer la secuencia del gen ya que no se encontraba disponible en la base de datos cuando se llevó a cabo este análisis. Para ello se realizó una búsqueda de secuencias expresadas o *ESTs* (acrónimo del inglés *expressed sequence tags*) de trigo disponibles en la base de datos *GenBank* utilizando para la búsqueda el cDNA de NTRC de arroz. De las diferentes *ESTs* encontradas se utilizaron tres secuencias solapantes para la obtención de la secuencia de cDNA para NTRC cuyos número de acceso en *GenBank* son CA655448.1, CJ708772.1 y CJ560167.1. La secuencia resultante estaba incompleta, careciendo de la región 5' UTR y del codón de inicio de la traducción (ATG). La comparación con otras secuencias disponibles en las bases de datos mostró que la NTRC de trigo comparte una alta identidad (95%) con la de cebada (Figura III.1.5).

La búsqueda de secuencias de la región 5' del cDNA utilizando las de cebada resultó en la identificación de una *EST* (número de acceso *GenBank* DR738974.1) peculiar, que comparte una alta identidad en la región 5' con el cDNA de cebada pero difiere en la región central (Figura III.1.6). Estos hechos indican la existencia de diferentes transcritos a partir de una misma secuencia génica como producto bien de orígenes de la transcripción diferentes o de maduraciones alternativas del mRNA.

Figura III.1.5. Secuencia parcial del cDNA que codifica NTRC de trigo

Alineamiento de la posible secuencia de cDNA de NTRC de trigo (TaNTRC) con la secuencia completa del cDNA de NTRC de cebada (HvNTRC) (número de acceso *GenBank* AK358552.1). La secuencia parcial *TaNtrC* se construyó a partir del alineamiento de las *ESTs* disponibles en la base de datos *GenBank* con los números de acceso: CA655448.1 (azul), CJ708772.1 (rojo) y CJ560167.1 (verde). El alineamiento de las secuencias se realizó mediante CLUSTALW utilizando el programa BioEdit. En amarillo se señala el codón de inicio de la traducción.

HvNIRC	GGCGGCTCC	TATCCAATCC	AACCCATCCG	CTCCCTCGG	CTCCACACCC	TCCGCTCCGC	TTGATTCCCT	TCCCGGCGCG	TCCACTCCGC	90
TaNIRC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1
Consensus	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
HvNIRC	CAACACCACC	CACCACCACC	CGACGCACAA	GCAGCCACCT	CGCTCCCTCC	CACCTCCCCC	TTCCCGCTCC	CCCCGCGCGC	GATGCGGGTC	180
TaNIRC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1
Consensus	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
HvNIRC	ACGCGCTCCG	CCGTGGCCGC	CGCCCTCTCC	TCCGCCCCCG	CGTCTCTCTC	CCACAGCCGA	GGCAGGGCCA	CCCCCTCTCC	CTGCGGGCCC	270
TaNIRC	-----CCTCG	CCGTGGCCGC	CGCCCTCTCC	TCCGCCCCCG	CGTCTCTCTC	CCACAGCCGA	GGCAGGGCCA	CCCCCTCTCC	CTGCGGGCCC	85
Consensus	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
HvNIRC	CTCCCG---	CCGCTCCCAA	GTCCAAGGCC	CTGCGCGCCG	CCGCGCGCCC	CGCGCGCCAC	GCCGTGACG	AGGACGCCCC	CGCTCCCTCT	357
TaNIRC	CTCCCGCCTC	CCGCTCCCAA	GTCCAAGGCC	CTGCGCGCCG	CCGCGCGCCC	CGCGCGCCAC	GCCGTGACG	AGGACGCCCC	CGCTCCCTCT	175
Consensus	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	169
HvNIRC	CCTCCCTCAG	ATCCTGGCAG	GGGAGTGGAG	AACCTGGTGA	TCATCGGTTT	AGGCCCGCCA	GGGTACACCG	CGGCCATCTA	CGCGCCACGG	447
TaNIRC	CCCCCTCAG	ATCCTGGCAG	GGGAGTGGAG	AACCTGGTGA	TCATCGGTTT	CGGCCCGCCA	GGGTACACCG	CGGCCATCTA	CGCGCCACGG	265
Consensus	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	255
HvNIRC	GCGAACCTGA	AACCCGTCGT	CTTCGAAGGT	TACCAAGTCG	CGGCTGTTCC	CGGAGGCCAG	CTGATGACCA	CCACCGAGGT	GGAGAATTTT	537
TaNIRC	GCGAACCTGA	AGCCCGTCGT	GTTCGAAGGT	TACCAAGTCG	CGGCTGTTCC	CGGAGGCCAG	CTGATGACCA	CCACCGAGGT	GGAGAATTTT	355
Consensus	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	339
HvNIRC	CCTGGGTTCC	CCGACGGCAT	AACCGGGCCT	GATCTCATGG	ACAAAATGCG	GAAGCAAGCG	GAGCGGTGGG	GTGCAGAGCT	TCACCAAGAG	627
TaNIRC	CCTGGGTTCC	CCGACGGCAT	CACCGGGCCT	GATCTCATGG	ACAAAATGCG	GAAGCAAGCG	GAGCGGTGGG	GTGCAGAGCT	TCACCAAGAG	445
Consensus	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	422
HvNIRC	GATGTCGAGT	TTGTGGATGT	GAAGAGCAGA	CGGTTTGTGA	TTCGTAGCAG	CGACCGAGAG	GTGAAATGTC	ATAGTGTAA	CATTGCAACT	717
TaNIRC	GATGTCGAGT	TTGTGGATGT	GAAGAGCAGA	CGGTTTGTGA	TTCGTAGCAG	CGACCGAGAG	GTGAAATGTC	ATAGTGTAA	CATTGCAACT	535
Consensus	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	501
HvNIRC	GGAGCTACTG	CGAAGCGACT	TCGATTACCT	CGTGAAGAAG	AATTTTGGAG	CAGAGGTATC	AGCGCATGTG	CAATATGTGA	TGGAGCATCA	807
TaNIRC	GGAGCTACTG	CGAAGCGACT	TCGATTACCT	CGTGAAGAAG	AATTTTGGAG	CAGAGGTATC	AGCGCATGTG	CAATATGTGA	TGGAGCATCA	625
Consensus	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	588
HvNIRC	CCTCTGTACA	AGGGTCAAGT	TCTTGGCGTC	GTTGGAGGAG	GAGATACAGC	TACCGAGGAA	GCGATATATT	TGACAAATA	TGCGTGCCAT	897
TaNIRC	CCTCTGTACA	AGGGTCAAGT	TCTTGGCGTC	GTTGGAGGAG	GAGATACAGC	TACCGAGGAA	GCGATATATT	TGACAAATA	TGCGTGCCAT	715
Consensus	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	678
HvNIRC	GTTCAATTAC	TTGTTGGAAG	GGACCAACTA	CGAGCATCCA	AAGCTATGCA	GGACCGAGTA	CTCAACAACC	CCAACATAAC	AGTACATTTT	987
TaNIRC	GTTCAATTAC	TTGTTGGAAG	GGACCAACTA	CGAGCATCCA	AAGCTATGCA	GGACCGAGTA	CTCAACAACC	CCAACATAAC	AGTACATTTT	805
Consensus	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	768
HvNIRC	AATACAGAAG	CTGTGGATGT	TGTCGGCAAT	ACCAAAGGAC	AGATGTCGGG	TATTCAAGTTG	AGGAGAATCG	ATACGGGAGA	GGAAAAAGTT	1077
TaNIRC	AATACAGAAG	CTGTGGATGT	TGTCGGCAAT	ACCAAAGGAC	AGATGTCGGG	TATTCAAGTTG	AGGAGAATCG	ATACGGGAGA	GGAAAAAGTT	895
Consensus	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	856
HvNIRC	CTTGAAGTGA	AAGGTCTATT	TTATGGGATA	GGGCATATCT	CAAAATAGTCA	GCTGCTAGAA	GGTCAAAATTG	AACCTGATAG	TTCTGGATAT	1167
TaNIRC	CTTGAAGTGA	AAGGTCTATT	TTATGGGATA	GGGCATATCT	CAAAATAGTCA	GCTGCTAGAA	GGTCAAAATTG	AACCTGATAG	TTCTGGATAT	985
Consensus	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	943
HvNIRC	ATTTTGGTTG	AGGAAGGCAC	GGCAAAAAC	TCAGTTGATG	CGGTATTGTC	TGCTGGTGAT	GTGCAGGATC	ATGAATGGAG	GCAAGCCGTT	1257
TaNIRC	ATTTTGGTTG	AGGAAGGCAC	GGCAAAAAC	TCAGTTGATG	CGGTATTGTC	TGCTGGTGAT	GTGCAGGATC	ATGAATGGAG	GCAAGCCGTT	1075
Consensus	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	1031
HvNIRC	ACTGCAGCTG	GATCTGGATG	TATAGCTGCT	TTGTCAAGTTG	AAAGATACCT	AGTCTCCAGT	GATCTTCTTA	TTGAATTCCA	CCAGCCTGTT	1347
TaNIRC	ACTGCAGCTG	GATCTGGATG	TATAGCTGCT	TTGTCAAGTTG	AAAGATACCT	AGTCTCCAGT	GATCTTCTTA	TTGAATTCCA	CCAGCCTGTT	1165
Consensus	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	1118
HvNIRC	CGCGAAGAGA	AAAAGAAGGA	GATTGAAGGC	AAAGATGTTG	AGATGGGCTT	TGACATTACT	CACACAAAGC	ACAAGGGACA	GTATGCACTC	1437
TaNIRC	CGCGAAGAGA	AAAAGAAGGA	GATTGAAGGC	AAAGATGTTG	AGATGGGCTT	TGACATTACT	CACACAAAGC	ACAAGGGACA	GTATGCACTC	1255
Consensus	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	1203
HvNIRC	CGCAAGTTAT	ACCATGGAAG	CCCAAGGCTC	ATTTTGGTTT	TATATACCTT	TCCAACATGT	GGTCCCTGCA	GAACATTAAA	ACCAATTTTG	1527
TaNIRC	CGCAAGTTAT	ACCATGGAAG	CCCAAGGCTC	ATTTTGGTTT	TATATACCTT	TCCAACATGT	GGTCCCTGCA	GAACATTAAA	ACCAATTTTG	1345
Consensus	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	1289
HvNIRC	AACAAGGTTA	TAGATGAGTA	TGACGAATAC	GTTCAATTTT	TTGAAATTGA	CATTGAAGAG	GACCCGAAA	TAGCAGAAGC	TGCAGGCATC	1617
TaNIRC	AACAAGGTTA	TAGATGAGTA	TGACGAATAC	GTTCAATTTT	TTGAAATTGA	CATTGAAGAG	GACCCGAAA	TAGCAGAAGC	TGCAGGCATC	1435
Consensus	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	1375
HvNIRC	ATGGGAACAC	CTTGTGTCCA	GTTCTTTAAA	AACAAAGAAA	TGATCAGGAC	TTTCTCTGGT	GTGAAGATGA	AGAAGGAATA	CCGGGAATTC	1707
TaNIRC	ATGGGAACAC	CTTGTGTCCA	GTTCTTTAAA	AACAAAGAAA	TGATCAGGAC	TTTCTCTGGT	GTGAAGATGA	AGAAGGAATA	CCGGGAATTC	1525
Consensus	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	1463
HvNIRC	ATTGAGTCGA	ACAAATGATC	TGAGCTCATT	GTTGTGCCA	GGGTTTGTAA	GTGTAATGGC	CTCCATTAC	ACATATATTG	ACTATATTTA	1797
TaNIRC	ATTGAGTCGA	ACAAATGATC	TGAGCTCATT	GTTGTGCCA	GGGTTTGTAA	GTGTAATGGC	CTCCATTAC	ACATATATTG	ACTATATTTA	1615
Consensus	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	1550
HvNIRC	GAAGCCACGC	TGGTGGGCAA	TTTTTGGTCA	AATT-CTCAG	ATGAGCTGCG	TGCAGTCA--	TGCCATAGGA	AATTAACCGA	TCCGCTTAT	1884
TaNIRC	GAAGCCACGC	TGGTGGGCAA	TTTTTGGTCA	AATT-CTCAG	ATGAGCTGCG	TGCAGTCA--	TGCCATAGGA	AATTAACCGA	TCCGCTTAT	1705
Consensus	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	1635
HvNIRC	TGAATCCAAA	ATATATTCTT	TGTTGTACAA	TATAACATCT	TGTTGACCCC	T-GCCATTGA	CCGGCGTTTC	ATGCTATACC	TCCACATGGT	1973
TaNIRC	TGAATCCAAA	ATATATTCTT	TGTTGTACAA	TATAACATCT	TGTTGACCCC	TGCTCATGTA	TCG-----	-----TCTCA	ACAATGTGCA	1783
Consensus	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	1703
HvNIRC	GCCCTC---	1979								
TaNIRC	TACCTCTTA	1792								
Consensus	*****									

Figura III.1.6. Alineamiento de una EST de NTRC de trigo con la secuencia completa del cDNA de NTRC de cebada
Alineamiento de una posible EST de NTRC de trigo, con número de acceso GenBank DR738974.1, con la secuencia completa del cDNA de NTRC de cebada (número de acceso GenBank AK358552.1). El alineamiento de las secuencias se realizó mediante CLUSTALW utilizando el programa BioEdit. En rojo se señala la región común de ambas secuencias. En amarillo se resalta el codón de inicio de traducción.

La proteína resultante de la traducción del cDNA parcial obtenido para la NTRC de trigo comparte la estructura de la enzima de otras plantas, es decir, con un posible péptido de tránsito al cloroplasto en el extremo N-terminal, y la presencia de los módulos NTR, con su sitio activo CAIC, y Trx, con su sitio activo CGPC (Figura III.1.7). La secuencia aminoacídica de esta proteína muestra además una alta identidad con las NTRC de otras especies cereales, compartiendo un 98% de identidad con la enzima de cebada, un 93% con la de *Brachypodium* o un 91% con la de arroz.

Para el estudio de la expresión de NTRC en trigo mediante qPCR se realizó una búsqueda de los cebadores y sondas específicos con el programa “*Probe Finder Software*” a partir de la secuencia de cDNA de NTRC de trigo definida previamente (Figura III.1.7). Del mismo modo se escogieron los cebadores y la sonda específica para el gen del rRNA 26S de trigo (número de acceso GenBank M37274.1) de expresión constitutiva y utilizado como control endógeno en estos experimentos. El estudio se llevó a cabo a partir de muestras de RNA total procedentes de semillas de trigo en las diferentes fases del desarrollo definidas previamente (Materiales y métodos) y de hoja de planta adulta.

III. RESULTADOS

```

1  GCCGTGGCCGCCCTCTCTCCGCCCGCCGCTCTCTCCACAGCCGAGGCGAGGCCACCCCTCTCTGCCGCCCTCCCGCC 90
   A V A A A L S S A P P S S S H S R G R A T P S S C R P L P A
91  TCCGCCTCCAAGTCCAAGGCCCTGCCGCCCGCCGCCCGCCCGCCGCGGTCGACGAGGAGGCCCGCCCTCCCTCCCGCTCA 180
   S A S K S K A L R A A A A P A A D A V D E E A P A S P P P S
181 GATCCTGGCAGGGAGTGGAGAACCTGGTGATCATCGGCTCCGGCCCCGAGGTTACACCGCGCCATCTACGCGCCGGCGAACCTG 270
   D P G R G V E N L V I I G S G P A G Y T A A I Y A A R A N L
271 AAGCCCGTCGTGTTTGAAGGCTACAGGTGGGGGTGTTCCCGAGGCCAGCTGATGACCAACCGANGTGGAGAATTTCCCTGGGTTT 360
   K P V V F E G Y Q V G G V P G G Q L M T T T X V E N F P G F
361 CCCGACGGCATCACCGGCCCTGACCTCATGGACAAAATGCGCAAGCAAGCGAGCGTGGGGTGGGAGCTTCAAGgAAGATGTTGAG 450
   P D G I T G P D L M D K M R K Q A E R W G A E L H K E D V E
451 TTTATAGATGTGAAGAATAGGCCGTTTGTATCCGTAGCAGTGACCGAGAGGTAAATCCCATAGTGAATCATTGCAACTGGAGCTACT 540
   F I D V K N R P F V I R S S D R E V K S H S V I I A T G A T
541 GCAAAGCGACTTAGATTACCTCGTGAAGAAGAAATTTGGAGTAGAGGTATCAGCGCATGTGCAATATGTGATGGAGCATCACCTCTGTAC 630
   A K R L R L P R E E E F W S R G I S A C A I C D G A S P L Y
631 AAGGGTCAAGTTCTTGGCGTCTGGAGGAGGTGATACAGCTACCGAGGAAGCGATATATTTGACAAAATATGCGTGCCATGTTTATTTA 720
   K G Q V L A V V G G G D T A T E E A I Y L T K Y A C H V H L
721 CTTGTTGAAGGGACCAACTACGAGCATCCAAAGCTATGCAGGACCGAGTACTCAACAACCCCAACATAACAGTACATTTCAATACAGAA 810
   L V R R D Q L R A S K A M Q D R V L N N P N I T V H F N T E
811 GCTGTGGATGTTGTCGGCAATACCAAGGACAGATGTCTGGTATTGAGTTGAGGAGAATCGATACGGGAGAGGAAAAAGTTCTTGAAGTG 900
   A V D V V G N T K G Q M S G I Q L R R I D T G E E K V L E V
901 AAAGGTCTATTTTATGGGATAGGACATACTCCAACAGTCAGCTGCTACAAGTCAAATGAACTTGATAGTTCTGGATATATTTGGTT 990
   K G L F Y G I G H T P N S Q L L Q G Q I E L D S S G Y I L V
   TaNTRC-QPCR Fw → ← TaNTRC-QPCR Rv
991 GACGAAGGCACAGCAAAACTTCAGTTGATGGCGTATTTGCTGCTGGTGATGTGCAGGATCATGAATGGAGGCAAGCCGTTACTGCAGCT 1080
   D E G T A K T S V D G V F A A G D V Q D H E W R Q A V T A A
1081 GGATCTGGATGTATAGCTGCTTTGTGAGTTGAAAGATACTTAGTCTCCAATGATCTTCTTGTGTAATTTACCAGCCTGTTCTGTGAAGAA 1170
   G S G C I A A L S V E R Y L V S N D L L V E F H Q P V R E E
1171 AAAAAGAGCAGATTGAAGGCAAGATGTCGAGATGGGCTTCGACATTACTCACACAAAGCACAAGGGACAGTATGCACTCCGCAAGTTA 1260
   K K K Q I E G K D V E M G F D I T H T K H K G Q Y A L R K L
1261 TACCATGGAAGTCCAAGGCTCATCTGGTTCTATATACTTCTCCAACATGTGGTCCCTGCAGAACCTTAAACCGATTTTGAACAAGGTT 1350
   Y H G S P R L I L V L Y T S P T C G P C R T L K P I L N K V
1351 ATAGATGAATATGACGAATACGTTTATTTGTTGAAATTGACATCGAGGAGGCCCTGAAATAGCAGAAGCTGCAGGCATAATGGGAACA 1440
   I D E Y D E Y V H F V E I D I E E D P E I A E A A G I M G T
1441 CCGTGTGTTTCAGTTCTTTAAAAACAAAGAAATGATCAGGACTTTCTCTGGTGTGAAGATGAAGAAGGAATACCGGAGTTCATCGAGTCG 1530
   P C V Q F F K N K E M I R T F S G V K M K K E Y R E F I E S
1531 AACAAATGAGCTGAGCTCATTTGTTGTCCAGGGTTTGAAGTGAATGGCCTCCATTTACACATATATTGACTATATTTAGAAGCCACG 1620
   N K *
1621 CTGGTGGGCAATTTTGGTCAAAATTCTCAGATGAGCCTGGTGCAGTCCGATGCCATAGGAAATTAACCGACCGCCCTTATTGAATCCAA 1710
1711 AATATATTCTTTGTTGTACAATATAACATCTTGTGACCCCTTGCTCATGATCGTCTCAACAATGTGCATACCTCTTA 1788

```

Figura III.1.7. Secuencia de cDNA del gen *TaNtrC* de trigo y su traducción a proteína

Secuencia parcial del cDNA que codifica NTRC de trigo y su traducción a proteína. Se resaltan en verde los residuos correspondientes al posible péptido de tránsito al cloroplasto, en rojo los residuos pertenecientes al módulo NTR de la proteína y en amarillo los correspondientes al módulo Trx. Las cisteínas de los sitios activos de cada módulo aparecen marcadas con un asterisco azul. Los oligonucleótidos *TaNTRC-QPCR Fw* y *TaNTRC-QPCR Rv* se utilizaron para la cuantificación de la expresión del mRNA mediante qPCR. El sitio de unión de la sonda aparece subrayado en gris.

En la Figura III.1.8.A se representan los niveles de mRNA del gen *TaNtrC* normalizados respecto a los niveles de rRNA 26S. Se observa un ligero aumento de los niveles de mensajero conforme avanza el desarrollo hasta alcanzar el máximo a los 18 dpa, para descender durante la maduración (25 dpa). El nivel de mensajeros en semillas fue muy inferior al de hojas.

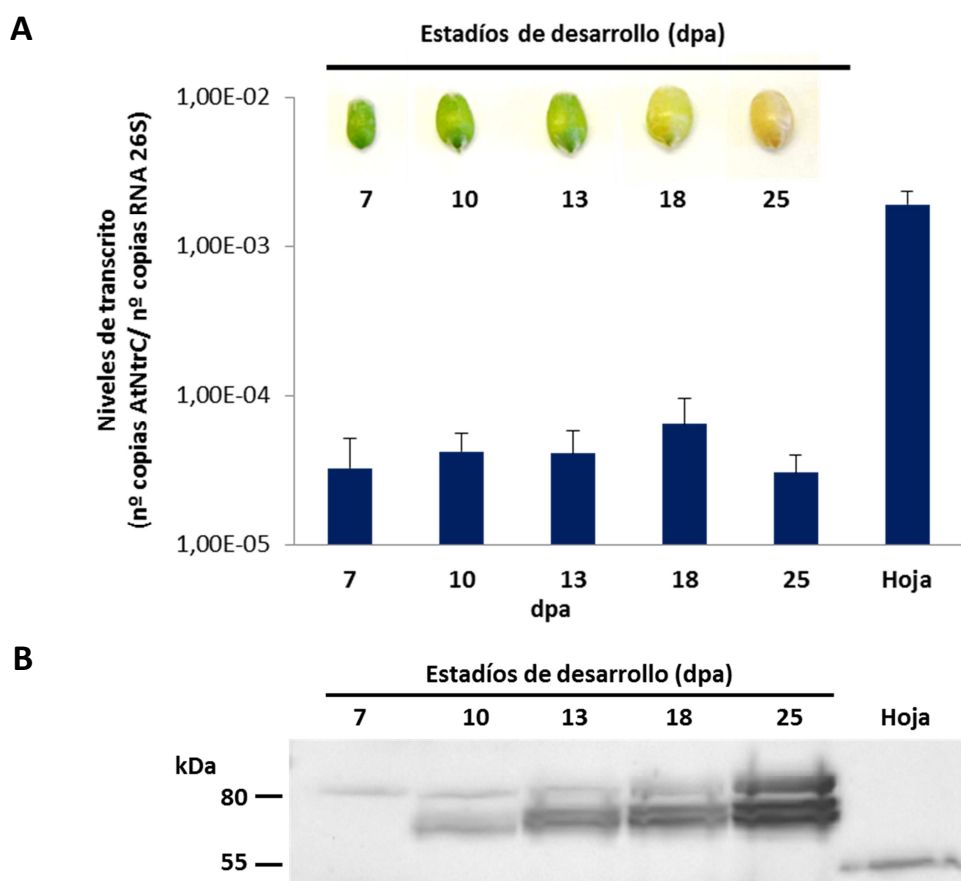


Figura III.1.8. Expresión de NTRC durante el desarrollo de semillas de trigo

(A) Se determinaron mediante qPCR los niveles de mRNA del gen *TaNtrC* en semillas de trigo en cada uno de los estadios de desarrollo establecidos 7, 10, 13, 18 y 25 días post-antesis (dpa) y de hojas de planta adulta. En cada caso se utilizaron 50 ng del cDNA sintetizado a partir del RNA total aislado en las diferentes muestras. Los resultados se muestran en relación a los niveles de rRNA 26S en cada muestra. (B) Análisis de la presencia de NTRC en las diferentes muestras mediante *Western blot* con un anticuerpo anti-NTRC. Se utilizaron extractos totales de proteínas de endospermo de semillas de trigo en cada estadio de desarrollo (50 µg de proteína) y de hoja (30 µg de proteína) en condiciones reductoras (tampones de extracción y de carga suplementados con βME 14 mM y DTT 10 mM). Los marcadores de peso molecular, en kDa, se indican a la izquierda.

El estudio de la presencia de la proteína en endospermo (Figura III.1.8.B) mediante análisis *Western blot* mostró la presencia de NTRC en este tejido durante todo el desarrollo de la semilla presentando un tamaño mayor al de la proteína reconocida en hoja, si bien, no se pudo determinar exactamente su tamaño en endospermo puesto que el anticuerpo reconocía diferentes proteínas de movimiento electroforético similar. El patrón de expresión de NTRC en endospermo en trigo es muy similar al previamente obtenido en arroz.

III.1.2. Estudios para la identificación de NTRC en endospermo de semillas de cereales

Los análisis descritos en semillas de dos cereales diferentes, arroz y trigo, revelaron la presencia de NTRC en endospermo pero con la peculiaridad de presentar un tamaño mayor al de la proteína presente en tejidos fotosintéticos. Para tratar de identificar esta nueva versión de la proteína en endospermo de semillas de cereales se iniciaron una serie estudios enfocados a conocer el gen que la codifica, la secuencia del transcrito y la composición aminoacídica de la proteína. Estos estudios se realizaron a partir de semillas de arroz en un estadio intermedio del desarrollo puesto que los resultados obtenidos para este cereal a nivel de proteína fueron más precisos que los obtenidos en semillas de trigo.

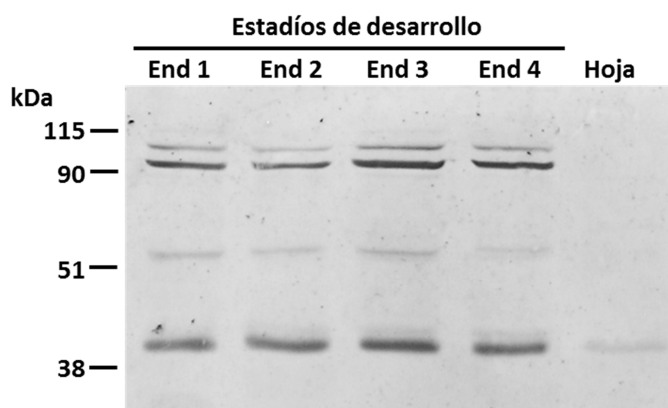


Figura III.1.9. Análisis *Western blot* de semillas y hoja de arroz con un anticuerpo anti-NTRB

Análisis de la presencia de NTRC en semillas de arroz en diferentes estadios de desarrollo (**End1 a End4**) mediante *Western blot* con un anticuerpo anti-NTRB. Se utilizaron extractos totales de proteínas de semillas de arroz en cada estadio de desarrollo (50 µg de proteína) y de hoja (30 µg de proteína) en condiciones reductoras (tampones de extracción y de carga suplementados con βME 14 mM y DTT 10 mM). Los marcadores de peso molecular, en kDa, se indican a la izquierda.

En primer lugar tratamos de confirmar que la proteína reconocida mediante *Western blot* en endospermo de arroz era NTRC y no otra proteína reconocida inespecíficamente por el anticuerpo. Como NTRC es una enzima bimodular, se puede detectar mediante análisis *Western blot* con el anticuerpo anti-NTRC que reconoce el módulo Trx de la proteína, pero también con un anticuerpo anti-NTRB reconocería el módulo NTR. En la Figura III.1.9 se observa que, mediante análisis *Western blot* de extractos crudos de proteínas de semillas de arroz en los diferentes estadios de desarrollo y de hoja, el anticuerpo anti-NTRB además de reconocer a NTRB, de unos 40 kDa, y a NTRC con el mismo tamaño de la proteína de hoja de unos 52 kDa, reconoció a la proteína de endospermo, ausente en extractos de hoja, del mismo tamaño que la proteína reconocida con el anticuerpo anti-NTRC (Figura III.1.4). Ambos

resultados indican que se trata de una proteína que posee un módulo NTR y un módulo Trx al igual que NTRC. A diferencia de los experimentos realizados anteriormente, en este caso se utilizaron extractos crudos de semillas en lugar de endospermo aislado para comprobar que se puede identificar también a NTRC de tejidos fotosintéticos en semillas incluyendo en el extracto un tejido verde como es el pericarpo que rodea al endospermo.

Aunque las electroforeisis mostradas se realizaron siempre en condiciones reductoras, para comprobar que la banda detectada en endospermo no se correspondía con un complejo de NTRC consigo misma, en forma de dímero, o con otra(s) proteína(s), las muestras se sometieron a un tratamiento previo con agentes reductores y desnaturalizantes. Muestras de extractos crudos de semillas de arroz tratadas previamente con urea 4 M, con DTT 0,1 M o con ambos agentes no variaban su movilidad electroforética frente a la misma muestra sin estos tratamientos previos (Figura III.1.10). Se comparó además la movilidad electroforética de las muestras tratadas con los agentes reductores con la de una muestra de la proteína recombinante OsNTRC purificada en la que además de la proteína monomérica pueden observarse los agregados que forma. Se aprecia que la proteína reconocida por el anticuerpo anti-NTRC en endospermo tiene un peso molecular inferior del dímero de NTRC. Estos resultados sugieren que la NTRC identificada en endospermo sería un único polipéptido de peso molecular mayor al de la proteína cloroplastídica.

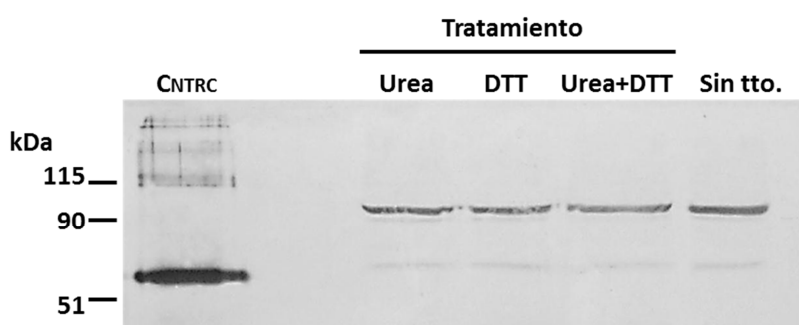


Figura III.1.10. Efecto del tratamiento con agentes reductores sobre la NTRC reconocida en endospermo de arroz
Análisis *Western blot* con un anticuerpo anti-NTRC de extractos proteicos totales de semillas de arroz en un estadio intermedio del desarrollo (50 µg de proteína) en condiciones reductoras (tampones de extracción y de carga suplementados con βME 14 mM y DTT 10 mM) y sometidas a diferentes tratamientos: Urea 4 M (**Urea**), DTT 0,1 M (**DTT**), urea 4 M + DTT 0,1 M (**Urea+DTT**) y sin tratamiento (**Sin tto.**). Una muestra de NTRC de arroz recombinante purificada (50 ng) se utilizó como control de movilidad electroforética (**CNTRC**). El análisis se realizó en condiciones reductoras. Los marcadores de peso molecular, en kDa, se indican a la izquierda.

Mediante análisis *Western blot* de extractos crudos de semillas de arroz en germinación se pudo comprobar que la presencia de la proteína inmunoreactiva de mayor tamaño no es exclusiva de endospermo en desarrollo (Figura III.1.11). El estudio de los diferentes tejidos diseccionados de semillas germinadas permitió detectar a la proteína de mayor peso molecular en cotiledón y raíz, si bien en estos tejidos también se detectó la NTRC de 52 kDa.

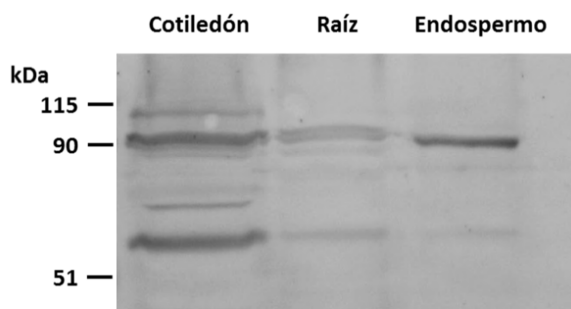


Figura III.1.11. Expresión de NTRC en semillas germinadas de arroz

Se comprobó la presencia de NTRC en semillas de arroz en desarrollo mediante análisis *Western blot* utilizando un anticuerpo anti-NTRC de tejidos diseccionados de semillas de arroz germinadas. Se cargaron muestras de 40 µg de proteínas de extractos proteicos totales en condiciones reductoras (tampones de extracción y de carga suplementados con βME 14 mM y DTT 10 mM) de cotiledón, raíz y endospermo de semillas de arroz germinadas durante 5 días. Los marcadores de peso molecular, en kDa, se indican a la izquierda.

Otra evidencia a favor de que la proteína de mayor peso molecular reconocida en endospermo de semillas de arroz era realmente una NTRC se obtuvo a partir de la identificación mediante MALDI-TOF de una muestra resultante de un experimento de cromatografía de afinidad (método descrito en Materiales y Métodos). Como NTRC es una proteína capaz de interaccionar consigo misma para la formación de un dímero catalíticamente activo (Perez-Ruiz and Cejudo, 2009), mediante cromatografía de afinidad con un mutante monocisteínico de la enzima se espera encontrar a la propia NTRC entre las proteínas capaces de interaccionar consigo misma. De este modo, utilizando un extracto de endospermo de arroz para la realización de la cromatografía de afinidad se podría encontrar la posible NTRC de endospermo entre las proteínas interactoras. Una de las fracciones resultantes de la elución con un agente reductor se separó mediante SDS-PAGE bidimensional. Las diferentes proteínas del tamaño esperado para la NTRC de endospermo separadas en el gel fueron analizadas mediante MALDI-TOF, identificando dos de ellas como NTRC (Figura III.1.12).

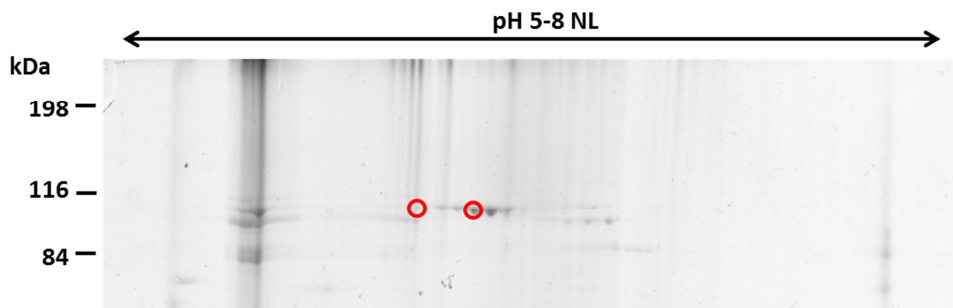


Figura III.1.12. SDS-PAGE bidimensional de la cromatografía de afinidad para la identificación de NTRC de endospermo de semillas de arroz

Una alícuota de 150 μ L de las proteínas eluidas con reductores en la cromatografía de afinidad para la identificación de NTRC de endospermo de semillas de arroz se precipitó y se separó mediante SDS-PAGE bidimensional utilizando una tira de rango de pH de 5 a 8 no lineal (pH 5-8 NL) y gel de acrilamida al 10%. El resultado se visualizó mediante tinción del gel con azul de *Coomassie*. En rojo se señalan las proteínas identificadas como NTRC mediante MALDI-TOF. Los marcadores de peso molecular, en kDa, se indican a la izquierda.

Paralelamente a los estudios proteómicos realizados se llevaron a cabo estudios a nivel de mensajeros con el objetivo de identificar y secuenciar el mRNA codificante para esta NTRC peculiar. En primer lugar se comprobó, mediante secuenciación del cDNA amplificado a partir de muestras de RNA total de endospermo de semillas de arroz, si el mRNA que codifica para la proteína en endospermo y hoja era el mismo o presentaba modificaciones en su secuencia. Para ello se utilizaron parejas de cebadores localizados en los extremos y región central de la secuencia conocida del cDNA de NTRC de arroz (Figura III.1.13). En endospermo solo se obtuvo amplificado utilizando la pareja de cebadores de la región central de cDNA. Se pudo comprobar que la secuencia del cDNA de NTRC de endospermo en la región amplificada es idéntica a la identificada en tejidos fotosintéticos (Figura III.1.13). Este resultado indicaba que las NTRC de endospermo y cloroplasto estarían codificadas por el mismo gen, sin embargo la ausencia de resultados en el extremo 5' sugieren la presencia de dos poblaciones diferentes de mRNA con diferente origen de la transcripción o con una maduración diferencial.

III. RESULTADOS

		OsNTRC 5' Fw	
AJ582621.1	CCATCCTCTCCCTCTCTCTACTCCACACCCCTCCGCTTCTCCACTCCTCCCTCGCGATGCGGTACGCGCCTCGCCGTGGCCGCCGCC		90
cDNA endosp	-----		1
Consensus			
AJ582621.1	TCTCGGCCAAGCGGTTGCGCGCTCGGCTGCCCGCCGTCGACGAGGAGGCCCGCATCCCGCCTCCATCAGATCTTGCAAGGGAG		180
cDNA endosp	-----		1
Consensus			
AJ582621.1	TGGAGAACTTGGTGATCATAGGCTCTGGCCCGCGGGGTACACTGCCGCGATTACGCCGCTCGGGCGAACCTCAAGCCCGCTGTGTTCG		270
cDNA endosp	-----		1
Consensus			
AJ582621.1	AAGGCTACCAGTTGGTGGCTTCTGGTGGGCAGCTGATGACCACCACCGAGGTGGAGAATTTCCCTGGGTTTCCGGATGGCGTCACTG		360
cDNA endosp	-----		1
Consensus			
AJ582621.1	GGCCTGATCTCATGGACAAAATGCGAAGCAAGCGGAGCGGTGGGTGCTGAGCTTCACCAGGAGGATGTTGAGTTTGTGAATGTGAAGA		450
cDNA endosp	-----		1
Consensus			
AJ582621.1	GCAGACCGTTTGTATTCTGTAGCAGTGATCGTGAGGTGAAATGCCATAGTGTAACTATTGCTACTGGTGCTGCTGCTAAGCGCCTTCGAT		540
cDNA endosp	-----		1
Consensus			
AJ582621.1	TACCTCGTGAAGATGAATTTTGGAGTAGAGGTATCAGTGATGTGAATATGTGATGGAGCATCCCACTATTTAAGGGTCAAGTTCTTG		630
cDNA endosp	-----TTG		3
Consensus		***	
		OsNTRC-sp Fw	
AJ582621.1	CAGTTGTTGGAGGTGGTGATACAGCTACAGAGGAAGCTATATATTTGACCAAATATGCACGTACGTTTCACTTGTTCGAAAGGATC		720
cDNA endosp	CAGTTGTTGGAGGTGGTGATACAGCTACAGAGGAAGCTATATATTTGACCAAATATGCACGTACGTTTCACTTGTTCGAAAGGATC		93
Consensus	*****		93
AJ582621.1	AGCTACGAGCATCAAAGCTATGCAGGACCGAGTACTCAACAATCCCAACATAACAGTACATTCAATACAGAAGCTGTGGATGTTGTCA		810
cDNA endosp	AGCTACGAGCATCAAAGCTATGCAGGACCGAGTACTCAACAATCCCAACATAACAGTACATTCAATACAGAAGCTGTGGATGTTGTCA		183
Consensus	*****		183
AJ582621.1	GCAATCCCAAGGCCAGATGTCTGGTATTCAACTGAAGAGAACCGACACGGGAGAGGAATCAGTTCTTGAGGTGAAAGGTCTATTCTATG		900
cDNA endosp	GCAATCCCAAGGCCAGATGTCTGGTATTCAACTGAAGAGAACCGACACGGGAGAGGAATCAGTTCTTGAGGTGAAAGGTCTATTCTATG		273
Consensus	*****		273
AJ582621.1	GCATAGGACACACTCCAAACAGTCAGTTGTTACAAGGTCAAATTGATCTTGACGATGCTGGTTATATTTTGGTTGAAGAGGCACAGCAA		990
cDNA endosp	GCATAGGACACACTCCAAACAGTCAGTTGTTACAAGGTCAAATTGATCTTGACGATGCTGGTTATATTTTGGTTGAAGAGGCACAGCAA		363
Consensus	*****		363
AJ582621.1	AAACATCAGTTGATGGTGTATTGCTGCTGGTGATGTGCAGGATCATGAATGGAGGCAAGCCGTTACTGCAGCTGGATCCGGATGTGTAG		1080
cDNA endosp	AAACATCAGTTGATGGTGTATTGCTGCTGGTGATGTGCAGGATCATGAATGGAGGCAAGCCGTTACTGCAGCTGGATCCGGATGTGTAG		453
Consensus	*****		453
AJ582621.1	CCGCTTTGTCGGTGGAAAGATACTTAGTTGCAACGACCTTCTTGTGAATTTCAACAGCCTGTTCCGCAAGAAAAGGAGAAGGAGATTA		1170
cDNA endosp	CCGCTTTGTCGGTGGAAAGATACTTAGTTGCAACGACCTTCTTGTGAATTTCAACAGCCTGTTCCGCAAGAAAAGGAGAAGGAGATTA		543
Consensus	*****		543
AJ582621.1	CAGATAGAGATGTCGAGATGGGCTTTGACATTTCTCACAAAAGCATAGGGGACAGTATGCACCTCCGCAAGTATATCATGAAAGTCCAA		1260
cDNA endosp	CAGATAGAGATGTCGAGATGGGCTTTGACATTTCTCACAAAAGCATAGGGGACAGTATGCACCTCCGCAAGTATATCATGAAAGTCCAA		633
Consensus	*****		633
AJ582621.1	GGCTTGCTGTGTTCTATATACTTCTCCAAATGTTGGTCTTCAGAACCTTAAAGCCAATTTCAAGCAAGGTTATAGATGAGTACAACG		1350
cDNA endosp	GGCTTGCTGTGTTCTATATACTTCTCCAAATGTTGGTCTTCAGAACCTTAAAGCCAATTTCAAGCAAGGTTATAGATGAGTACAACG		723
Consensus	*****		723
AJ582621.1	AACACGTTCAATTTTGTGCAAAATTGACATCGAGGAGGATCTGAAATAGCAGAAGCTGCAGGCATCATGGGAACACCATGTGTTCAATTTT		1440
cDNA endosp	AACACGTTCAATTTTGTGCAAAATTGACATCGAGGAGGATCTGAAATAGCAGAAGCTGCAGGCATCATGGGAACACCATGTGTTCAATTTT		813
Consensus	*****		813
AJ582621.1	TTAAAAATAAAGAAATGCTCAGGACTGTCTCTGGTGTAAAAATGAAGAAGGAATATAGGGAGTTTATCGAGTCAAAACAAATGAGCTGAAC		1530
cDNA endosp	TTAAAAATAAAGAAATGCTCAGGACTGTCTCTGGTGTAAAAATGAAGAAGGAATATAGGGAGTTTATCGAGTCAAAACAAATGAGCTGAAC		896
Consensus	*****		896
AJ582621.1	CCAACATACGATTCAAAATTTAAAGTGAATAGTCTTCTTTGCCCACTACTGACTATTTCTAGCTGCCACCGTGGTGGCAATTTTGGT		1620
cDNA endosp	-----		896
Consensus			
AJ582621.1	CAAAAAATTTTCAGATGGGCCGGGTGTAGTGGGTTCAGAGGAAATTAGCCGGTCTCTCTATT		1684
cDNA endosp	-----		896
Consensus			
		OsNTRC 3' Rv	

Figura III.1.13. Secuencia del fragmento del cDNA de NTRC amplificado en endospermo de semillas de arroz
Alineamiento de la secuencia del fragmento de cDNA de NTRC amplificado a partir de RNA de endospermo de semillas de arroz (cDNA endosp) con la secuencia completa del cDNA (número de acceso GenBank AJ582621.1). El alineamiento de las secuencias se realizó mediante CLUSTALW utilizando el programa BioEdit. Los oligonucleótidos OsNTRC 5' Fw y OsNTRC-sp Fw se utilizaron junto con OsNTRC 3' Rv.

La posibilidad de la existencia de dos transcritos diferentes en hoja y en endospermo para NTRC se estudió mediante análisis *Northern blot*. Para la identificación de los mRNAs se diseñaron, a partir de la secuencia conocida del cDNA de NTRC de hoja, dos sondas específicas: una en la región codificante del módulo NTR y otra en el módulo Trx. Se realizaron ensayos *Northern blot* a partir de extractos totales de RNA de endospermo de semillas de arroz y de hoja adulta. Se pudo observar que el marcaje en hoja y en endospermo muestra una movilidad electroforética distinta (Figura III.1.14) confirmando la existencia de dos poblaciones de mRNA para NTRC según el tejido. Los resultados obtenidos concuerdan además con la información procedente de los estudios de la proteína, ya que el transcrito de mayor tamaño se detectó en muestras de endospermo lo que justificaría el mayor tamaño de la proteína en este tejido. Se obtuvo el mismo resultado con ambas sondas diseñadas, confirmando la existencia de los módulos NTR y Trx en la NTRC de endospermo.

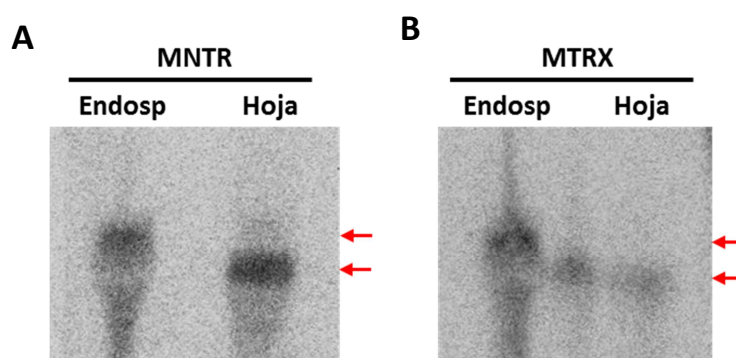


Figura III.1.14. Comparación de los transcritos de NTRC en endospermo y hoja de arroz

Análisis *Northern blot* de los mRNAs de NTRC en endospermo y hoja de arroz, utilizando sondas específicas para la región codificante del módulo NTR (**MNTR**) (**A**) y del módulo Trx (**MTRX**) (**B**) del cDNA que codifica NTRC de arroz (número de acceso GenBank AJ582621.1). Se cargó en cada caso 10 µg de RNA total. Con flechas en rojo se resalta la diferente movilidad electroforética de los transcritos marcados.

Los resultados de secuenciación y *Northern blot* sugerían una posible maduración diferencial en endospermo generando un transcrito mayor que el presente en hojas. Con estas premisas, se iniciaron estudios de clonación de los extremos del cDNA codificante de NTRC en endospermo mediante RLM-RACE (*RNA Ligase Mediated Rapid Amplification of cDNA Ends*) con el objetivo de conocer su secuencia completa. Para ello se diseñaron cebadores específicos en los extremos 5' y 3' de la secuencia conocida del cDNA de NTRC (Figura III.1.15) que, junto con los cebadores específicos de los adaptadores unidos al transcrito (Materiales y Métodos), permitirían la amplificación por PCR de los extremos del cDNA y su posterior secuenciación. Los experimentos de RLM-RACE se llevaron a cabo a partir de muestras de mRNA purificado de endospermo de semillas de arroz y, como control del experimento, de hoja de planta adulta.



Figura III.1.15. Localización de los cebadores para la clonación de los extremos del cDNA mediante RACE

A partir de la secuencia completa del cDNA que codifica NTRC (número de acceso GenBank AJ582621.1) se diseñaron en los extremos 5' (A) y 3' (B) del mismo, oligonucleótidos para la clonación de los extremos del cDNA mediante RLM-RACE. En amarillo y en rojo se resaltan los codones de inicio y final de la transcripción, respectivamente.

En los ensayos de RLM-RACE del extremo 5' en hoja y endospermo, se incluyeron además controles del proceso consistentes en la utilización de un cDNA sintetizado a partir de una muestra de mRNA sin el tratamiento con TAP (*Tobacco Acid Pyrophosphatase*), donde no se produciría amplificado al no poder unirse el adaptador. En los diferentes ensayos de PCR realizados para la clonación del extremo 5' del cDNA que codifica NTRC (Figura III.1.16 A y B) no se consiguió un amplificado concreto para su aislamiento, obteniendo el mismo resultado tanto en las muestras tratadas como sin tratar con TAP. En el extremo 3' por el contrario sí se consiguieron tanto en hoja como en endospermo amplificados definidos cuya movilidad electroforética era similar en ambas muestras (Figura III.1.16 C), lo que sugería un mismo procesamiento del mRNA en este extremo. Para conocer la secuencia nucleotídica del extremo 3' clonado se aislaron ambos amplificados y se secuenciaron.

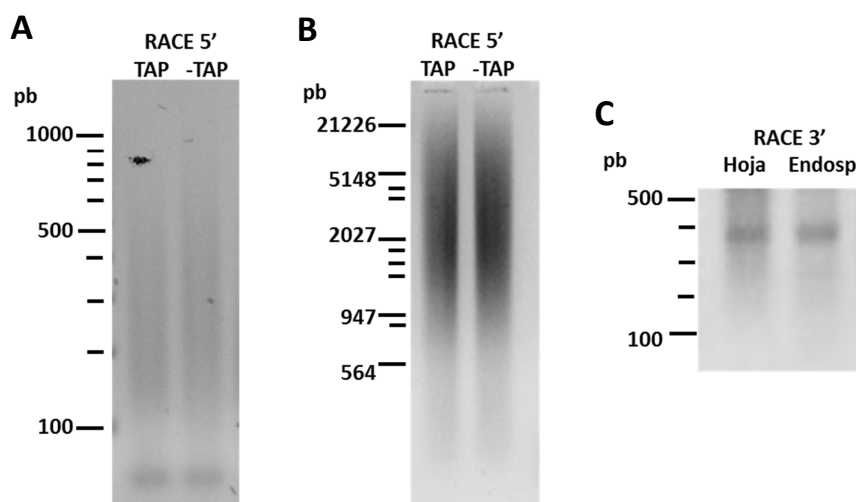


Figura III.1.16. Amplificación de los extremos 5' y 3' del cDNA para NTRC mediante RLM-RACE

A partir de muestras de mRNA aisladas de hoja y endospermo (250 ng de RNA Poli(A)⁺ en cada caso) se sintetizó mediante RT-PCR el cDNA que se utilizó como molde para los experimentos de RLM-RACE de los extremos 5' (A y B) y 3' (C) de hoja y endospermo de arroz. Los experimentos de RLM-RACE del extremo 5' en hoja (A) y en endospermo (B) se realizaron sobre muestras de cDNAs sintetizados a partir de mRNA con (TAP) o sin (-TAP) tratamiento previo con TAP (*Tobacco Acid Pyrophosphatase*).

La secuenciación de los cDNAs clonados de hoja y endospermo de arroz (Figura III.1.17) mostró que en ambos casos el extremo 3' del cDNA codificante de NTRC posee una composición nucleotídica idéntica, exceptuando cuatro nucleótidos localizados justo antes de la cola poliA terminal del mRNA que están ausentes en el cDNA de hoja. Estas secuencias son idénticas además a la secuencia conocida del mRNA de NTRC con número de acceso GenBank AJ582621.1, cuyo codón de parada de la traducción se mantiene conservado en ambos cDNAs clonados.

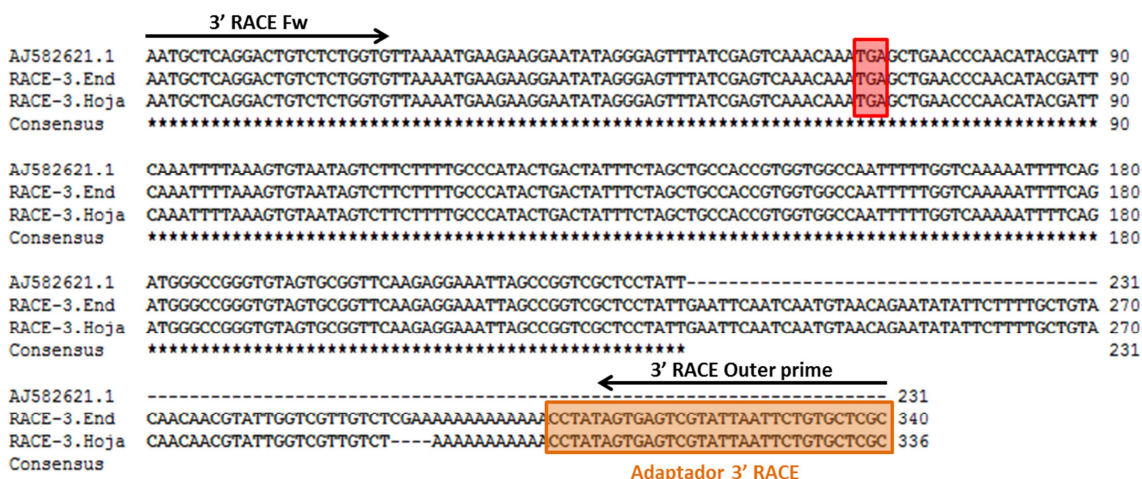


Figura III.1.17. Extremo 3' de los cDNAs de NTRC sintetizados a partir de mensajeros de endospermo y hoja de arroz

Alineamiento de las secuencias del extremo 3' de cDNA de NTRC obtenidas mediante RLM-RACE de muestras de endospermo (RACE-3.End) y hoja (RACE-3.Hoja) de arroz con la secuencia completa del cDNA (número de acceso AJ582621.1). La amplificación del extremo 3' del cDNA se realizó con los cebadores 3'RACE Fw y 3'RACE Outer prime (suministrado en el RLM-RACE kit). En rojo se resalta el codón de finalización de la traducción y en naranja la secuencia del adaptador del extremo 3' (suministrado en el RLM-RACE kit).

En conjunto estos estudios ponen de manifiesto la presencia de una proteína inmuno-reactiva con anticuerpos que detectan a NTRC en endospermo de semillas de arroz y que se identifica como NTRC mediante MALDI-TOF. Sin embargo, la movilidad electroforética de esta proteína tiene un peso molecular superior al esperado para NTRC, que es el de la enzima detectada en tejidos fotosintéticos. Los diferentes intentos de aislar secuencias del mensajero de esta posible nueva forma de NTRC, tanto en la región central como en la región 3' del gen, confirman que los mensajeros de hoja y endospermo son idénticos en estas regiones. Los análisis de RT-PCR indican que la región 5' difiere, sin embargo, no hemos podido aislar esta región 5' del cDNA que codificaría la proteína de mayor tamaño.

III.1.3. Localización de NTRC en endospermo de semillas de cereales

Para obtener más información sobre la localización de NTRC en semillas de cereales realizamos análisis inmunocitoquímicos sobre cortes histológicos de semillas de trigo en desarrollo. La elección de este cereal para la realización de los ensayos de inmunolocalización se debió a la consistencia del endospermo de su semilla de trigo durante todo el desarrollo, que lo diferencia del endospermo de semillas de arroz que en sus etapas iniciales e intermedias tiene una consistencia lechosa-pastosa. Se utilizaron semillas de trigo en tres estadios de desarrollo: inicial (5 dpa), intermedio (13 dpa) y tardío (25 dpa). En la fase inicial se detectaba NTRC mayoritariamente en el pericarpo, que en esta etapa del desarrollo es un tejido verde fotosintético y, en menor proporción, en endospermo (Figura III.1.18 A-B). En la fase intermedia la proteína se localizó principalmente en la capa de aleurona donde la señal detectada fue muy intensa, estando también presente en menor medida en endospermo y en pericarpo, que comienza su degradación (Figura III.1.18 C-D). En la fase tardía NTRC se localizó en endospermo y aleurona con un contenido de la proteína similar (Figura III.1.18 E-F).

A pesar de ser NTRC una proteína cloroplastídica en tejidos fotosintéticos (Serrato et al., 2004) y de localización plastidial en tejidos no fotosintéticos (Kirchsteiger et al., 2012), los ensayos de inmunolocalización realizados sugieren una localización citosólica en las células del endospermo y de la capa de aleurona. Si consideramos la hipótesis generada en los experimentos de identificación de la NTRC de endospermo en arroz, donde la proteína difiere de la cloroplastídica en su extremo amino, la localización citosólica podría deberse a la pérdida del péptido de tránsito que sí tiene la proteína cloroplastídica.

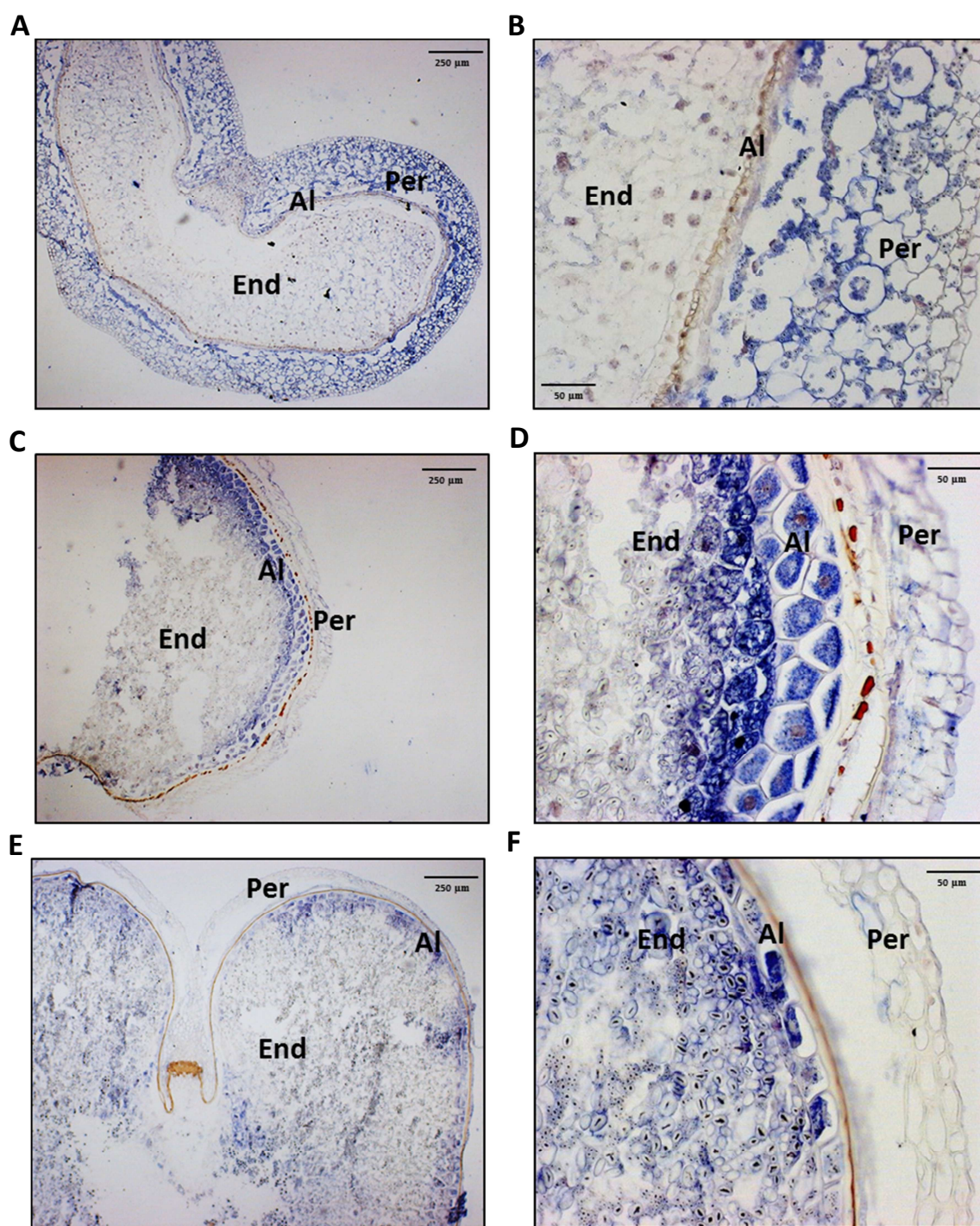


Figura III.1.18. Inmunolocalización de NTRC en semillas de trigo

Las secciones longitudinales (10 μ m) de las semillas de trigo a 5 dpa (A y B), 13 dpa (C y D), 25 dpa (E y F) se incubaron con anticuerpo anti-NTRC. **End**, endospermo; **Al**, capa de aleurona; **Per**, pericarpio. La barra indica la escala en micrómetros (μ m).

Se quiso comparar el patrón de localización de NTRC en semillas con el de una proteína identificada previamente como diana suya tanto en tejidos fotosintéticos como no fotosintéticos, la ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa) (Michalska et al., 2009). Esta proteína tiene una localización exclusivamente plastidial excepto en endospermo de semillas de cereales, donde presenta también una isoforma de localización citosólica que incrementa su abundancia a medida que avanza el desarrollo de la semilla (Lee et al., 2007). De este modo, el análisis inmunocitoquímico de semillas de trigo con un anticuerpo anti-AGPasa estaría detectando tanto la forma plastidial como la citosólica, siendo más abundante la citosólica en las etapas intermedia y tardía del desarrollo. Los resultados de la inmunolocalización de la AGPasa en semillas de trigo en las etapas intermedia y tardía (13 y 25 dpa, respectivamente) mostraron un patrón de localización muy similar al mostrado por NTRC en dichas etapas (Figura III.1.19), lo que apoya la idea de una posible regulación redox de esta enzima dependiente de NTRC en este tejido.

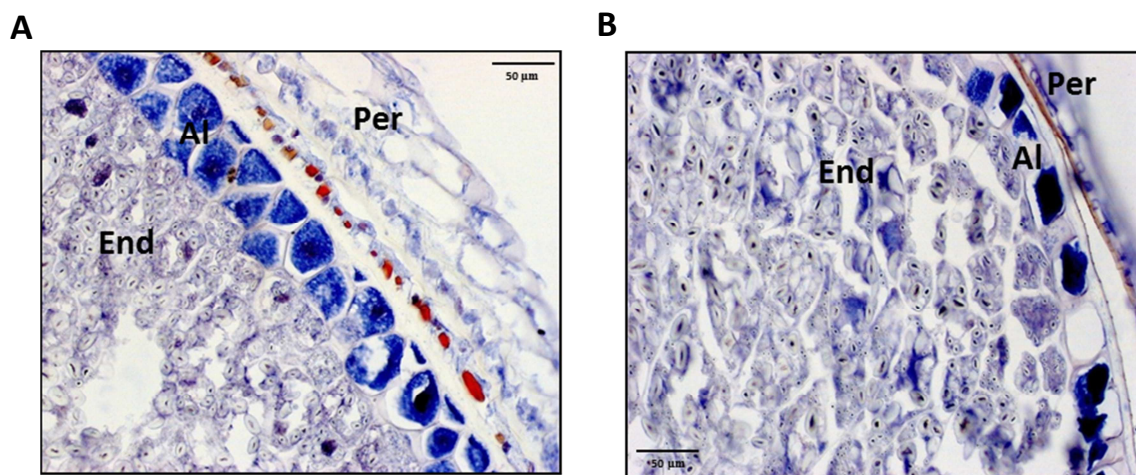


Figura III.1.19. Inmunolocalización de AGPasa en semillas de trigo

Las secciones longitudinales (10 µm) de las semillas de trigo a 13 dpa (**A**) y 25 dpa (**B**) se incubaron con anticuerpo anti-AGPasa. **End**, endospermo; **Al**, capa de aleurona; **Per**, pericarpo. La barra indica la escala en micrómetros (µm).

III.2. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS QUE INTERACCIONAN CON NTRC EN ENDOSPERMO DE SEMILLAS DE CEREALES

En este trabajo se ha descrito la presencia de NTRC en un nuevo tejido heterotrófico, el endospermo de semillas de cereales. Esta nueva localización, en un tejido altamente especializado hacia la síntesis de almidón de reserva, sugiere la participación de esta enzima en nuevas funciones diferentes de las ya descritas para tejidos fotosintéticos. En endospermo, al igual que en otros tejidos heterotróficos, NTRC estaría participando en la regulación redox de enzimas utilizando como poder reductor el NADPH generado en la ruta oxidativa de las pentosas fosfato. Partiendo de estas premisas, este trabajo se centró en la búsqueda e identificación de proteínas diana de NTRC en endospermo de semillas de cereales con los objetivos de determinar los procesos biológicos en los que participa como modulador redox y de describir las nuevas funciones que estaría desarrollando en este tejido.

Desde la primera evidencia de regulación redox de proteínas con el descubrimiento del sistema ferredoxina/tiorredoxina en cloroplastos, hace ya más de 40 años (Buchanan et al., 1967), han sido numerosos los trabajos centrados en la búsqueda de proteínas diana de tiorredoxinas. Las tiorredoxinas, tanto del sistema ferredoxina/tiorredoxina del cloroplasto como del sistema NADP/tiorredoxina del citosol y mitocondria, participan en la regulación redox de sus proteínas diana mediante la formación reversible de puentes disulfuro. Los primeros trabajos de búsqueda de proteínas diana de tiorredoxinas se basaban en métodos bioquímicos (Buchanan et al., 2002). Con los avances en proteómica de los últimos años, se han desarrollado metodologías más eficientes para la detección e identificación de posibles proteínas dianas de tiorredoxinas como son el etiquetado de proteínas con sondas capaces de unirse específicamente a grupos tiol o la cromatografía de afinidad utilizando tiorredoxinas mutadas en la cisteína resolutora del sitio activo. A estas técnicas le suceden una separación electroforética en gel (SDS-PAGE) en una o dos dimensiones y la identificación de las posibles proteínas diana mediante espectrofotometría de masas. Como resultado de estos trabajos, actualmente se han identificado aproximadamente 500 proteínas diana de tiorredoxinas (Montrichard et al., 2009).

Siendo NTRC una proteína que contiene un módulo NTR y un módulo Trx, capaz de funcionar por sí misma como un sistema NADP/tiorredoxina, y basándonos en los conocimientos generados en la búsqueda de proteínas diana de tiorredoxinas, se diseñaron experimentos de búsqueda de proteínas diana de NTRC en endospermo de semillas de cereales mediante cromatografía de afinidad utilizando un mutante monocisteínico del sitio

activo del módulo tiorredoxina de NTRC. Este método permitiría la identificación de proteínas que interaccionan con NTRC mediante el establecimiento de puentes disulfuro, por tanto, susceptibles de estar sometidas a regulación redox mediada por la enzima. Como método complementario se realizaron experimentos de inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-NTRC con extractos de endospermo de semillas en desarrollo con el que esperamos obtener un conjunto de proteínas que interaccionan con NTRC, no necesariamente a través de puentes disulfuro.

III.2.1. Identificación de proteínas diana de NTRC en endospermo de semillas de arroz (*Oriza sativa*)

La elección del arroz como primera opción para la realización de los experimentos de búsqueda de dianas de NTRC en endospermo de semillas de cereales se fundamentó en diversos motivos: las semillas de arroz poseen un endospermo de tamaño considerable y de fácil aislamiento en estadios intermedios de su desarrollo y las ventajas que aporta la disponibilidad de la secuencia completa de su genoma para la identificación de las posibles candidatas. Para la búsqueda de las proteínas diana tanto por cromatografía de afinidad como por inmunoprecipitación se utilizó como material de partida endospermo aislado de semillas de arroz en un estadio intermedio del desarrollo.

III.2.1.1. Dianas identificadas por cromatografía de afinidad

La cromatografía de afinidad se realizó utilizando una versión de NTRC mutada en la cisteína resolutora (C380S) del sitio activo del módulo tiorredoxina. Este mutante monocisteínico de NTRC permite el establecimiento de un puente disulfuro con una cisteína oxidada de la proteína diana, pero es incapaz de resolver esta unión para regresar a su forma oxidada (Figura III.2.1). De este modo, las proteínas diana de NTRC quedan covalentemente unidas a ella y solo pueden ser eluidas mediante el uso de agentes reductores.

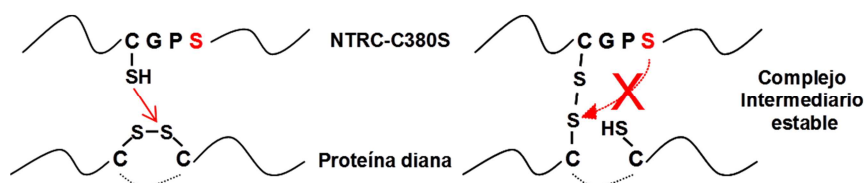


Figura III.2.1. Esquema de la formación de un complejo intermediario estable entre el mutante monocisteínico NTRC(C380S) y su proteína diana

La metodología seguida para la realización de la cromatografía de afinidad fue la descrita en Materiales y métodos, donde las proteínas unidas a NTRC en la columna se eluían en tres pasos sucesivos, cada uno realizado con tampones con diferentes propiedades, de los que obteníamos proteínas que interaccionan con NTRC de diferente manera:

- La primera elución se realizaba por intercambio iónico mediante la aplicación de un gradiente salino (de 0 a 1 M de NaCl) que permitía la elución de proteínas que interaccionan con NTRC mediante interacciones electrostáticas y que, por tanto, no son necesariamente proteínas diana de NTRC.
- La segunda elución se realizaba por reducción mediante la aplicación de agentes reductores (150 mM β -mercaptoetanol o 10 mM TCEP) capaces de romper los puentes disulfuro establecidos entre la NTRC mutada y sus posibles proteínas diana, lo que permitiría la identificación proteínas que interaccionan con la enzima por formación de un puente disulfuro.
- La tercera elución se realizaba mediante la aplicación de un gradiente de imidazol (de 0 a 500 mM) provocando la separación del mutante monocisteínico de NTRC, unido a la columna por su cola de His, y, junto con ésta proteínas que permanecían aún unidas probablemente por interacción hidrofóbica.

La utilización de dos agentes reductores diferentes para la elución de las posibles proteínas diana de NTRC se debió a que tras el análisis de los primeros experimentos de cromatografía de afinidad realizados con β -mercaptoetanol, donde proteínas eluidas con el agente reductor se identificaban también en las fracciones eluidas con imidazol, se consideró la posibilidad de que la reducción de los puentes disulfuro entre NTRC y sus posibles proteínas diana no estaba siendo eficiente con el agente empleado. En los siguientes experimentos realizados se optó por la utilización de un agente reductor más estable y eficiente como es el TCEP.

Los perfiles cromatográficos obtenidos de los ensayos realizados con β -mercaptoetanol o con TCEP como agentes reductores (Figura III.2.2) fueron muy similares salvo en las fracciones correspondientes a la elución con el reductor. En la elución con β -mercaptoetanol se detectó una mayor absorbancia a 280 nm debida a que el mismo β -mercaptoetanol absorbe a esta longitud de onda. En ambos casos se obtuvo una mayor elución de proteínas de la columna con la aplicación de imidazol debida principalmente al mutante NTRC.

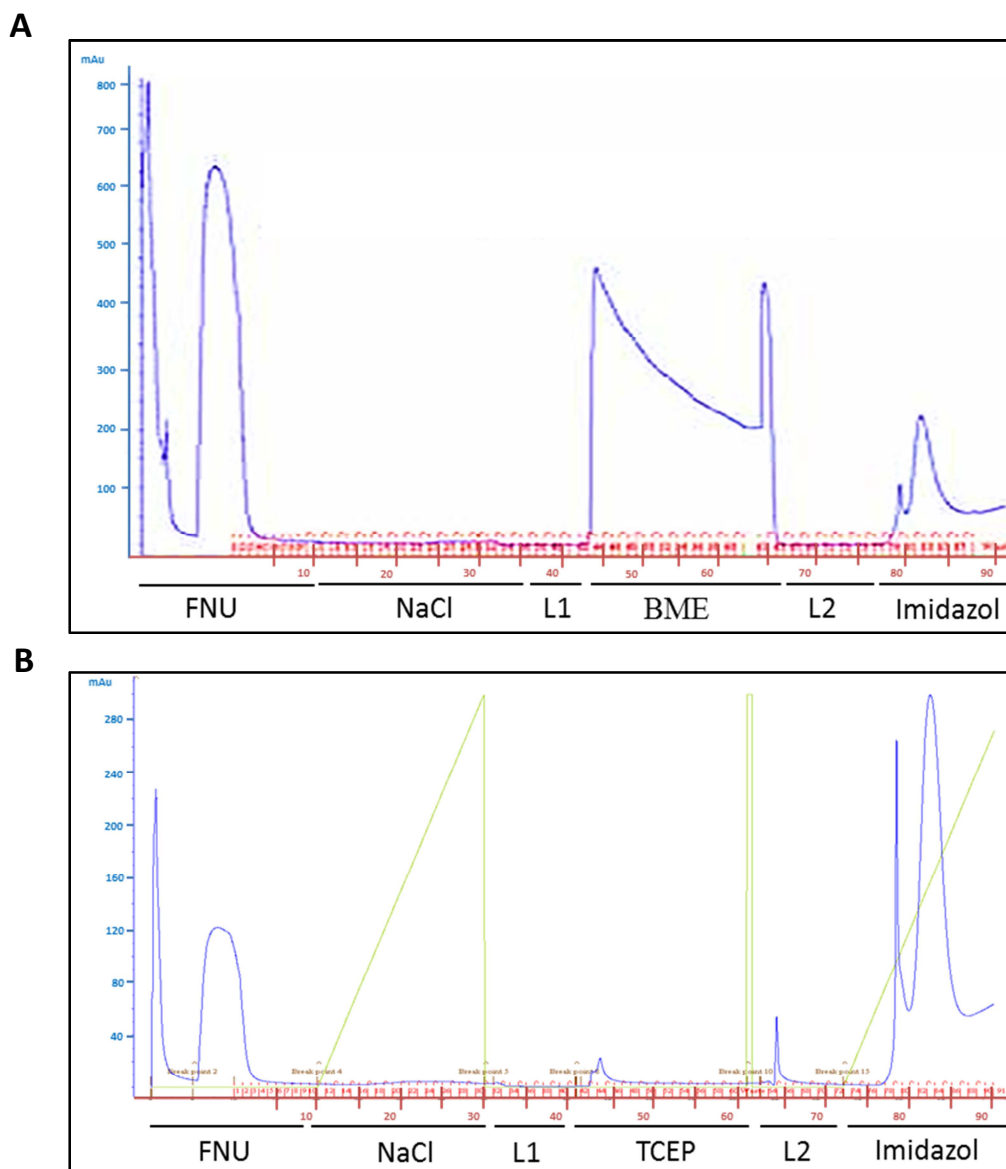


Figura III.2.2. Perfil de elución de las cromatografías de afinidad realizadas con extractos de endospermo aislado de semillas de arroz en desarrollo

Perfiles cromatográficos de las proteínas eluidas en las cromatografías de afinidad para la identificación de proteínas diana de NTRC en endospermo de semillas de arroz utilizando como agente reductor β -mercaptoetanol (A) o TCEP (B). En cada caso, la primera elución corresponde con la fracción proteica no unida a la columna (FNU). A continuación se realizó una elución con un gradiente de NaCl de 0 a 1 M (NaCl), seguido de una elución por reducción con 150 mM de β -mercaptoetanol (BME) (A) o 10 mM de TCEP (TCEP) (B) y una elución con un gradiente de imidazol de 0 a 500 mM (Imidazol). Entre las eluciones con NaCl, β -mercaptoetanol e imidazol se realizaron lavados con tampón fosfato (L1 y L2). En azul se representa la absorbancia (mAu) de las proteínas eluidas y en rojo las fracciones recogidas.

Las proteínas de las diferentes fracciones se separaron mediante electroforesis (Figura III.2.3). En las fracciones donde la cantidad de proteínas era escasa, principalmente en las eluciones con NaCl, con β -mercaptoetanol y algunas fracciones de la elución con TCEP, se cargaron tres fracciones consecutivas conjuntamente.

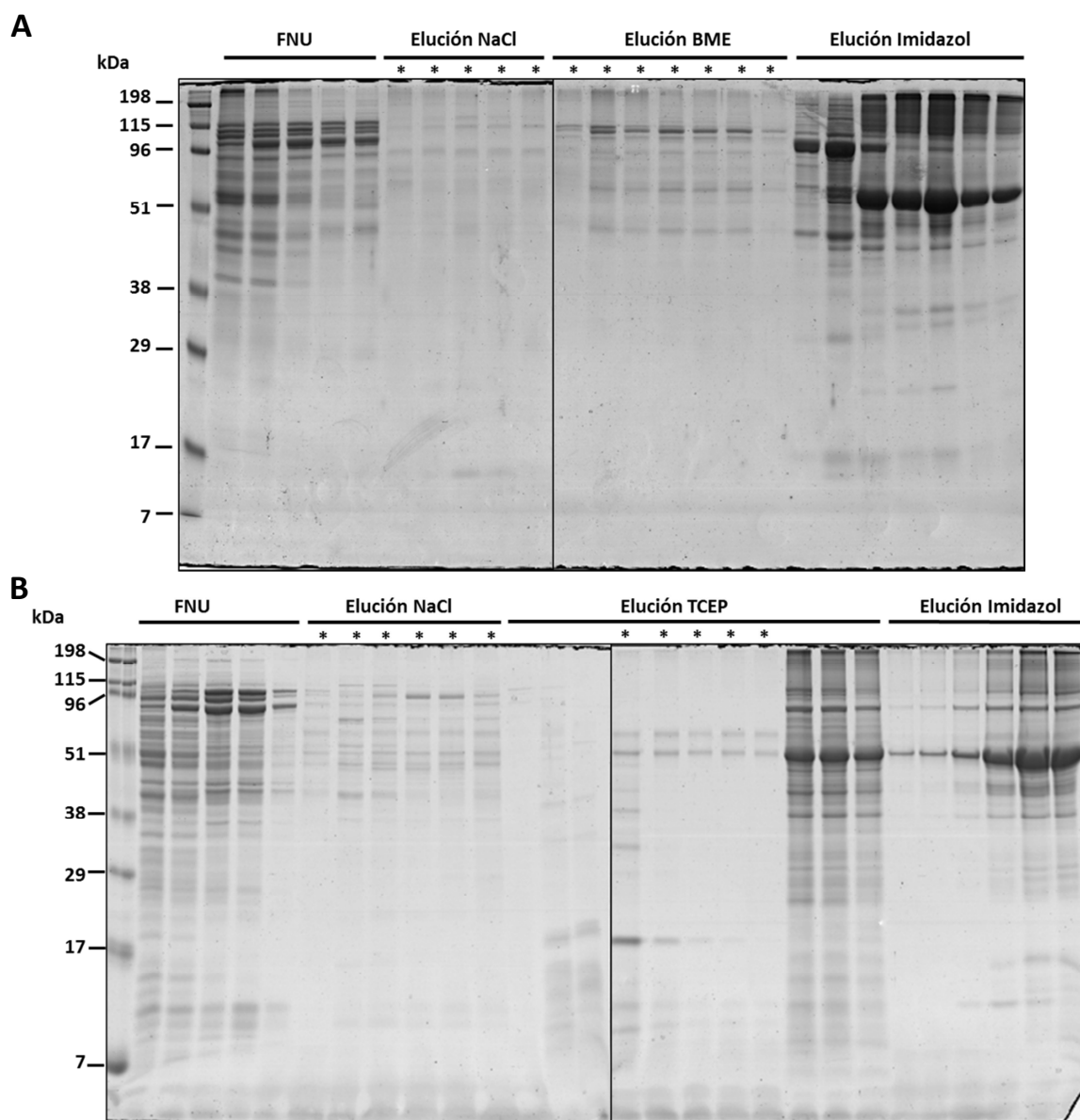


Figura III.2.3. Separación electroforética de las proteínas eluidas de la cromatografía de afinidad en endospermo de semillas de arroz

Las diferentes fracciones de la cromatografía de afinidad utilizando β -mercaptoetanol (**A**) o TCEP (**B**) como agente reductor se separaron mediante SDS-PAGE al 12%. El resultado se visualizó mediante tinción con azul de *Coomassie*. Se cargaron alícuotas de 100 μ L de las fracciones de proteína no unida (FNU), de 150 μ L de las fracciones eluidas con NaCl, β -mercaptoetanol (BME) y TCEP, previamente precipitadas con TCA, y 70 μ L de las fracciones eluidas con imidazol. * indica tres fracciones consecutivas juntas. Los marcadores de peso molecular, en kDa, se indican a la izquierda.

Posteriormente se tomaron muestras de un total de 220 bandas de las distintas eluciones para su identificación por MALDI-TOF. De todas las muestras analizadas, en el 50% de las muestras se identificó una única proteína, en el 30% de las muestras se identificaron dos o incluso tres proteínas diferentes, mientras que un 20% de las muestras analizadas no aportó ningún resultado. En total se identificaron 59 proteínas diferentes, detalladas en la Tabla III.2.1, de las que aproximadamente el 50% fue identificada repetitivamente en los diferentes experimentos.

Para cada proteína identificada se indica el número de cisteínas conservadas. Todas las proteínas identificadas, excepto tres, poseen al menos una cisteína conservada en su secuencia. Estas son *Dirigent-like protein*, *Nucleoside diphosphate kinase 1* y *Ricin B-related lectin domain containing protein (R40c1 protein)* y se obtuvieron en las fracciones eluidas con imidazol, es decir, susceptibles de interacción diferente de puente disulfuro. Además, se comprobó si las proteínas aquí identificadas habían sido previamente identificadas como proteínas diana de tiorredoxinas. Entre las 28 proteínas previamente identificadas como posibles dianas de tiorredoxinas se encontró *Nucleoside diphosphate kinase 1*, que a pesar de no poseer ninguna cisteína en su secuencia, fue identificada también como posible proteína diana de tiorredoxinas en semillas germinadas de *Medicago truncatula* mediante marcaje con monobromobimano (mBBBr) (Alkhalfioui et al., 2007). Por último, se especifica la posible localización subcelular de cada proteína.

Tabla III.2.1. Posibles dianas de NTRC en endospermo de semillas de arroz identificadas mediante cromatografía de afinidad

Para cada proteína se especifica el número de identificación según la base de datos UniprotKB, la elución a partir de la cual se ha obtenido (S, sal; B, β -Mercaptoetanol; T, TCEP; I, imidazol); el número de cisteínas conservadas en plantas (Cis); si ha sido previamente identificada como diana de tiorredoxinas (Trx) y su posible localización subcelular (C, citosol; CP, cloroplasto; AP, amiloplasto; P, plastidial; M, mitocondria; RE, retículo endoplasmático; N, núcleo; PC, pared celular).

Proteína	UniprotKB ID	Elución	Cis	Trx	Posible localización
2-isopropylmalate synthase B, putative, expressed	Q2QXY9	I	7		CP
60S ribosomal protein L5-1 (RPL5A)	Q0JGY1	S	1		C
Acetolactate synthase 1, chloroplastic	Q6K2E8	B	3		CP/ P
Acetyl-CoA carboxylase	A3B296	I	18	●	CP/P
Actin-1, putative, expressed	Q2QLI5	T	4	●	C
Actin-7, putative, expressed	Q67G20	I	4	●	C
Adenylate kinase A	Q08479	S	4	●	C
ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit	Q7G065	B,T,I	7	●	CP/ AP/ C
ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit	P15280	S,B,I	4	●	CP/ AP/ C
Aldolase C-1	Q5N725	S	5		CP/C
Allergen RA16	Q8H4L8	S,I	10		C
Alpha 1,4-glucan phosphorylase L isozyme	P27598	I	8	●	CP/AP/P
Alpha-amylase/subtilisin inhibitor	P29421	T,I	4	●	C
Annexin P33	Q67VZ1	I	1		MP
Cupin family protein	Q852L2	I	2		C
Cytochrome P450 family protein	Q0DUT2	I	2		RE
Dirigent-like protein	Q53NP8	I	0		RE
Elongation factor EF-1	O64937	T	6	●	C
Elongation factor EF-2	Q6H4L2	S,B,I	15	●	C
Eukaryotic aspartyl protease family protein, expressed	Q53NE7	S	12		C

Formin-like protein 3 //OsFH3	Q7G6K7.2	S	7		C
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic 3	Q6K5G8	B,T,I	2	●	C
Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein	P49027	I	7	●	C
HSP70, Dnak-type molecular chaperone Bip	Q6Z7B0	S,B,T	3	●	RE
Isoamylase (debranching enzyme)	Q0J4C6	I	14		CP/ AP
NADP-specific isocitrate dehydrogenase	Q7F280	B,I	6	●	C/ M
Nucleoside diphosphate kinase 1	Q7XC37	I	0	●	CP/ C/ M
Pentatricopeptide, putative, expressed	Q2R1Y4	B	4		P/ M
Phenylalanine ammonia-lyase	Q6K6Q1	B	8	●	CP/ C
Probable alpha-glucosidase	Q653V7	S	3		C
Probable N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase	Q6AV34	B,T	4		CP
Probable sarcosine oxidase	Q0J0I7	I	4		C
Protein Brittle-1, chloroplastic/amyloplastic	Q6Z782	I	4	●	AP
Pullulanase	P93416	B,T,I	2		CP/ AP
Putative annexin P35	Q6Z6A7	I	1		MP
Putative Calcineurin B subunit	Q6Z8S1	S	2		C
Putative dihydrolipoamide acetyltransferase	Q6ZKB1	T	1	●	CP/ M
Putative DNA-binding protein GBP16	Q5W6H1	S	7		N
Putative ent-kaurene oxidase	Q5Z5S0	T	3		CP
Putative fumarylacetoacetate hydrolase	Q6H7M1	T	6		C
Putative GTP-binding protein	Q6Z1J6	B	5	●	C
Putative sorbitol dehydrogenase	Q6ZBH2	B,T,I	12	●	CP/ C
Pyruvate, phosphate dikinase 1, chloroplastic	Q6AVA8	B,T,I	8	●	CP
Ricin B-related lectin domain containing protein (R40c1 protein)	Q10M12	I	0		C
RNA binding protein Rp120	Q6H547	S	5	●	N
S-adenosylmethionine synthetase 2	P93438	B,I	6	●	C
Seed allergenic protein RAG2	Q01882	T,I	10		C
Starch branching enzyme 1	Q01401	T,I	3		CP/ AP
Starch branching enzyme 3	Q6H6P8	I	4	●	CP/ AP
Sucrose synthase 2	P30298	I	7		C
Sucrose synthase 3	Q43009	B,T,I	3		C
Thioredoxin reductase NTRC	Q70G58	B,T,I	5		CP/ AP
Topoisomerase-like protein	Q0JCA4	I	4		N
Trypsin/alpha-amylase inhibitor family protein	Q7X8H9	T	9	●	C
Tubulin alpha-1 chain,	Q75GI3	I	12	●	C
Ubiquitin-specific protease 12, putative, expressed	Q2QQM3	I	8		C
Universal stress protein (Usp) family protein	Q60EJ0	T	3	●	C
Universal stress protein (Usp) family protein	Q5ZAV7	T	3	●	C
Xylanase inhibitor protein 2	Q53NL5	T,I	4		PC

III.2.1.2. Dianas de NTRC identificadas mediante inmunoprecipitación

La inmunoprecipitación de NTRC de extractos de endospermo de semillas de arroz se realizó utilizando un anticuerpo específico anti-NTRC diseñado contra el módulo tiorredoxina de la proteína. El uso de este anticuerpo conjugado con perlas de proteína A Sepharosa, tal y como se describe en Materiales y Métodos, permite la separación específica de NTRC presente en la muestra así como de las proteínas o complejos proteicos que estén interaccionando con ella. De este modo, esperamos la identificación de posibles proteínas diana de NTRC interaccionando con ella mediante puente disulfuro o mediante otro tipo de interacción, o bien porque forma parte de un complejo proteico donde alguna de las proteínas sea diana de NTRC.

La inmunoprecipitación se llevó a cabo sobre extractos proteicos totales obtenidos de endospermo de semillas de arroz desprovistas del pericarpo. Las diferentes fracciones obtenidas en el proceso se separaron mediante SDS-PAGE y se visualizaron mediante tinción con azul de *Coomassie* (Figura III.2.4 A). Paralelamente, como control negativo, se realizó el mismo procedimiento utilizando suero preinmune en cuyas fracciones no se detectaron proteínas con esta tinción (Figura III.2.4 B).

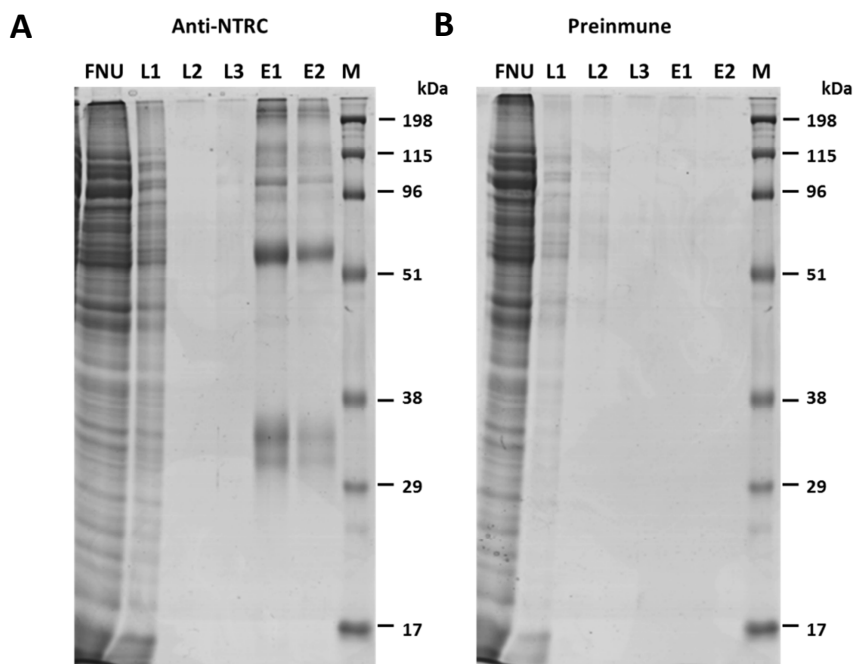


Figura III.2.4. Separación electroforética de las proteínas de las fracciones obtenidas en la inmunoprecipitación de NTRC de endospermo de semillas de arroz

Alícuotas (25 μ L) de las diferentes fracciones proteicas obtenidas en el proceso de inmunoprecipitación de NTRC de endospermo de semillas de arroz según el protocolo descrito en *Materiales y Métodos*, se separaron mediante SDS-PAGE al 12% en condiciones reductoras. La inmunoprecipitación se realizó con anticuerpo anti-NTRC (A) o con suero preinmune (B). El resultado se comprobó mediante tinción de los geles con azul de *Coomassie*. FNU, fracción proteica no unida; L1, L2 y L3, lavados; E1 y E2, eluciones; M, marcadores de peso molecular, especificados en kDa a la derecha.

Se tomaron muestras de todas las bandas visibles para su posterior análisis e identificación mediante MALDI-TOF, que resultó en la identificación predominantemente de las inmunoglobulinas, que seguían estando presentes en las fracciones correspondientes a las eluciones. Para comprobar si el experimento estaba funcionando correctamente analizamos mediante *Western blot* la presencia de NTRC. Sin embargo, debido a la similitud de movilidad electroforética de inmunoglobulinas y NTRC no fue posible la identificación de esta mediante *Western-blot*. Como NTRC tiene un punto isoeléctrico cercano a 5 y el de las inmunoglobulinas es muy básico, abordamos la separación mediante SDS-PAGE bidimensional utilizando tiras de pH de bajo rango. De este modo se pudo identificar mediante *Western blot* a NTRC en las eluciones de la inmunoprecipitación (Figura III.2.5) aunque en este caso la proteína reconocida por el anticuerpo se corresponde con la NTRC de menor tamaño característica de tejidos fotosintéticos. De este modo se demostraba la presencia de esta NTRC también en endospermo de semillas de cereales.

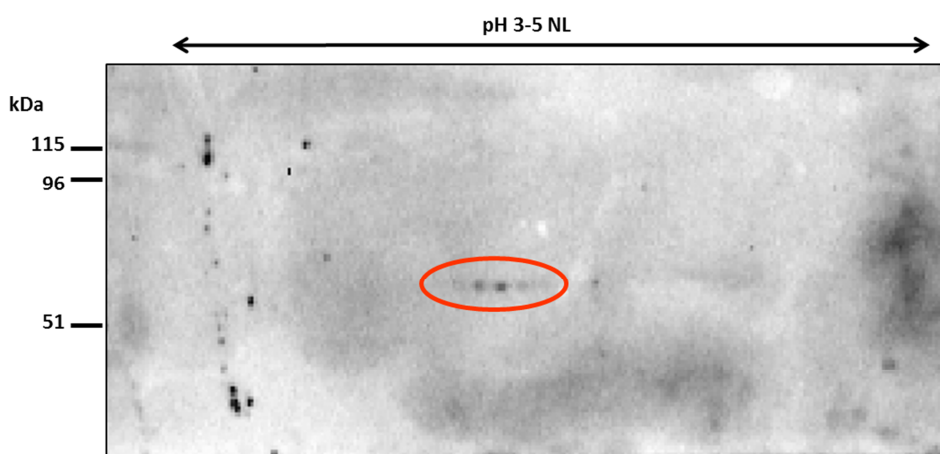


Figura III.2.5. Identificación de NTRC en las proteínas inmunoprecipitadas de endospermo de semillas de arroz

Extracto de proteínas de endospermo de semillas de arroz se inmunoprecipitó con anticuerpo anti-NTRC según el protocolo descrito en *Materiales y Métodos*. Una alícuota de 25 μ L de la primera elución del proceso se separó mediante SDS-PAGE bidimensional utilizando en la primera dimensión tiras de isoelectroenfoque de rango de pH de 3 a 5 no lineal (NL) y en la segunda geles de acrilamida al 10%. El resultado se analizó mediante *Western blot* con anticuerpo anti-NTRC. En rojo se resalta los *spots* correspondientes a NTRC. Los marcadores de peso molecular, en kDa, se indican a la izquierda.

Los sucesivos experimentos se comprobaron mediante SDS-PAGE monodimensional, mientras que las fracciones correspondientes a la elución de las proteínas interactoras de NTRC se separaron mediante SDS-PAGE bidimensional para facilitar su separación e identificación (Figura III.2.6). En este caso, se utilizaron tiras de isoelectroenfoque de amplio rango de pH que, aunque no excluyen a las inmunoglobulinas en la electroforesis, permiten la identificación de otras proteínas de punto isoeléctrico extremo (ácido o básico).

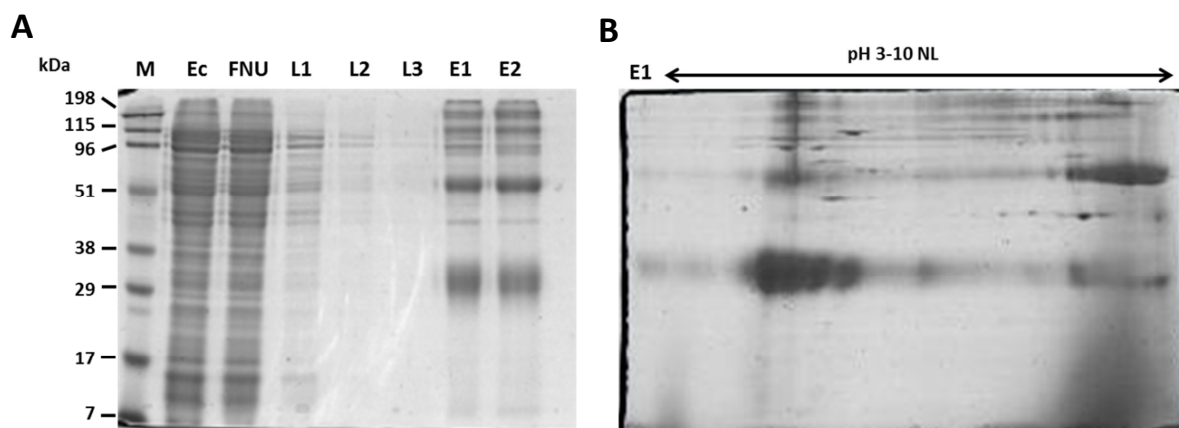


Figura III.2.6. Análisis mediante electroforesis bidimensional de las posibles proteínas diana de NTRC inmunoprecipitadas de endospermo de semillas de arroz

Extracto de proteínas de endospermo de semillas de arroz se inmunoprecipitaron con anticuerpo anti-NTRC según el protocolo descrito en *Materiales y Métodos*. 30 μ g de proteínas del extracto y alícuotas de 25 μ L de las diferentes fracciones obtenidas en el proceso se separaron mediante SDS-PAGE al 12% (A). La primera elución (E1) se precipitó y se analizó mediante electroforesis bidimensional (B) utilizando en la primera dimensión tiras de isoelectroenfoque de rango de pH de 3 a 10 no lineal (NL) y en la segunda geles de acrilamida al 12%. El resultado se visualizó mediante tinción de los geles con azul de Coomassie. Ec, extracto crudo; FNU, fracción proteica no unida; L1, L2 y L3, lavados; E1 y E2, eluciones; M, marcadores de peso molecular, especificados en kDa a la izquierda.

Se analizaron mediante MALDI-TOF un total de 180 muestras de los diferentes experimentos realizados y se identificaron un total de 35 proteínas (Tabla III.2.2), la mayoría de forma consistente en las diferentes réplicas del experimento realizadas.

Al igual que para las proteínas identificadas mediante cromatografía de afinidad, se especifica para cada candidata el número de cisteínas conservadas, si habían sido identificadas previamente como proteínas dianas de tiorredoxinas y su posible localización subcelular. Todas las proteínas identificadas poseen cisteínas conservadas. Un caso excepcional lo constituye la *Phosphoglycerate kinase*, que tiene dos cisteínas en su secuencia una de las cuales se encuentra conservada exclusivamente en cereales. Otro caso es el de *Ricin B-related lectin domain containing protein (R40g2 protein)* cuya secuencia es muy similar a *R40c1 protein* identificada previamente mediante cromatografía de afinidad en este trabajo. De las 35 posibles proteínas diana de NTRC identificadas mediante inmunoprecipitación, 24 habían sido previamente identificadas como posibles dianas de tiorredoxinas.

Tabla III.2.2. Posibles dianas de NTRC en endospermo de semillas de arroz identificadas mediante inmunoprecipitación

Para cada proteína identificada se especifica el número de identificación según la base de datos UniprotKB, el número de cisteínas conservadas en los ortólogos de plantas (Cis), si ha sido previamente identificada como diana de tioredoxinas (Trx) y su posible localización subcelular (C, citosol; CP, cloroplasto; AP, amiloplasto; P, plastidial; M, mitocondria; RE, retículo endoplasmático; MP, membrana plasmática; PX, peroxisoma).

Proteína	UniprotKB ID	Cis	Trx	Posible localización
2-isopropylmalate synthase B, putative, expressed	Q2QXY9	7		CP
60S Ribosomal protein L4/L1 family protein	Q0D868	1	●	C
Actin-1	Q10DV7	4	●	C
Actin-3	Q10AZ4	4	●	C
Actin-7, putative, expressed	Q67G20	4	●	C
ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit	Q7G065	7	●	CP/ AP/ C
ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit	P15280	4	●	CP/ AP/ C
ATP synthase subunit beta, mitochondrial	Q01859	2	●	M
Chaperonin-60 (mitochondrial)	Q8H903	5	●	M
Cytochrome P450 72A1 family protein	Q0JL27	1		RE
Cytochrome P450 family protein	Q0DUT2	2		RE
Elongation factor EF-2	Q6H4L2	15	●	C
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Q7FAH2	2	●	C
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic	Q0J8A4	2	●	C
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic 3	Q6K5G8	2	●	C
Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein	P49027	7	●	C
Heat shock protein 70 (HSP70)	Q40693	7	●	C
HSP70, Dnak-type molecular chaperone Bip	Q6Z7B0	3	●	RE
Phosphoglycerate kinase	Q6H6C7	0	●	C
Protein Brittle-1, chloroplastic/amyloplastic	Q6Z782	4	●	P
Protein TOC75, chloroplastic	Q84Q83	7		CP/P
Pullulanasa	P93416	2		CP/ AP
Putative chaperonin 60 beta	Q9LWT6	4	●	CP
Putative hydroxypyruvate reductase	Q6YU90	3		CP/ PX
Pyruvate, phosphate dikinase 1, chloroplastic	Q6AVA8	8	●	CP
Receptor kinase-like protein	Q0J8X0	2		MP
Ricin B-related lectin domain containing protein (R40g2 protein)	Q6Z4N6	0		C
Starch branching enzyme 1	Q01401	3		CP/ AP
Starch branching enzyme 3	Q6H6P8	4	●	CP/ AP
Stromal 70 kDa heat shock-related protein	Q2QV45	2	●	CP
Sucrose synthase 1	P31924	5	●	C
Sucrose synthase 3	Q43009	3		C
Tubulin beta-1 chain	Q43594	11	●	C
Tubulin beta-5 chain	P46265	10	●	C
Tubulin beta-7 chain	P37832	10	●	C

III.2.1.3. Comparación de resultados de ambos métodos

Mediante dos técnicas complementarias como son la cromatografía de afinidad y la inmunoprecipitación, se han identificado un total de 79 posibles proteínas diana de NTRC en endospermo de semillas de arroz. Las proteínas aquí identificadas estarían participando en diferentes procesos celulares que tienen lugar en el endospermo de semillas de cereales como son el metabolismo, la síntesis y degradación de proteínas, formando parte de la estructura celular, funcionando como proteínas de almacenamiento, de defensa o de respuesta a estrés, en la transducción de señales, el procesamiento del DNA y RNA, la homeostasis celular o el transporte de proteínas (Tabla III.2.3). De acuerdo a esta clasificación, el metabolismo y más concretamente, el metabolismo del carbono, es el proceso celular que alberga un mayor número de candidatas; siendo coherente con la principal función del endospermo de cereales, la síntesis y almacenamiento de almidón. Entre las proteínas identificadas en este trabajo como posibles dianas de NTRC en endospermo se encuentran un total de 42 proteínas identificadas previamente como posibles dianas de tiorredoxinas.

Tabla III.2.3. Clasificación de las posibles proteínas diana de NTRC identificadas en endospermo de arroz según su función

Las proteínas que han sido previamente identificadas como dianas de tiorredoxinas se indican con *

METABOLISMO

Metabolismo de carbohidratos

ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit*
ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit*
Aldolase C-1
Alpha 1,4-glucan phosphorylase L isozyme (starch phosphorylase)*
Alpha-amylase/subtilisin inhibitor*
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic*
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic 3*
Isoamylase (debranching enzyme)
NADP-specific isocitrate dehydrogenase*
Phosphoglycerate kinase*
Probable alpha-glucosidase // Maltase
Protein Brittle-1, chloroplastic/amyloplastic (BT1)*
Pullulanase
Putative dihydrolipoamide acetyltransferase*
Putative sorbitol dehydrogenase*
Pyruvate, phosphate dikinase 1, chloroplastic*
Starch branching enzyme 1
Starch branching enzyme 3 *
Sucrose synthase 1*
Sucrose synthase 2
Sucrose synthase 3
Trypsin/alpha-amilase inhibitor family protein*

Síntesis de ácidos grasos

Acetyl-CoA carboxylase*

Síntesis y degradación de aminoácidos

2-isopropylmalate synthase B, putative, expressed

Acetolactate synthase 1, chloroplastic

Phenylalanine ammonia-lyase*

Probable N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase

Probable sarcosine oxidase

Putative fumarylacetoacetate hydrolase

Putative hydroxypyruvate reductase (glycerate dehydrogenase)

S-adenosylmethionine synthetase 2*

ATP síntesis/transformación

Adenylate kinase A*

ATP synthase subunit beta, mitochondrial*

Nucleoside diphosphate kinase 1*

SÍNTESIS Y DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS**Traducción**

60S Ribosomal protein L4/L1 family protein*

60S ribosomal protein L5-1 (RPL5A)

Elongation factor EF-1*

Elongation factor EF-2*

Plegamiento

Heat shock protein 70 (HSP70)*

Chaperonin-60 (mitochondrial)*

HSP70, Dnak-type molecular chaperone Bip*

Putative chaperonin 60 beta*

Stromal 70 kDa heat shock-related protein

Proteolisis

Eukaryotic aspartyl protease family protein, expressed

Putative DNA-binding protein GBP16

Ubiquitin-specific protease 12, putative, expressed

PROTEÍNAS DE ALMACENAMIENTO EN SEMILLAS

Allergen RA16

Cupin family protein

Ricin B-related lectin domain containing protein (R40c1 protein)

Ricin B-related lectin domain containing protein (R40g2 protein)

Seed allergenic protein RAG2

ESTRUCTURA CELULAR

Actin-1*

Actin-1, putative, expressed*

Actin-3*

Actin-7, putative, expressed*

Formin-like protein 3 //OsFH3

III. RESULTADOS

Tubulin alpha-1 chain,*
Tubulin beta-1 chain*
Tubulin beta-5 chain*
Tubulin beta-7 chain*

DEFENSA DE LA PLANTA

Dirigent-like protein
Xylanase inhibitor protein 2

RESPUESTA A ESTRÉS

Annexin P33
Putative annexin P35
Universal stress protein (Usp) family protein (Q60EJ0)*
Universal stress protein (Usp) family protein (Q5ZAV7)*

TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein *
Putative Calcineurin B subunit
Putative GTP-binding protein*
Receptor kinase-like protein
RNA binding protein Rp120*

PROCESAMIENTO DEL DNA Y RNA

Pentatricopeptide, putative, expressed
Topoisomerase-like protein

HOMEOSTASIS REDOX CELULAR

Thioredoxin reductase NTRC

TRANSPORTE DE PROTEÍNAS

Protein TOC75, chloroplastic

OTROS

Cytochrome P450 72A1 family protein
Cytochrome P450 family protein
Putative ent-kaurene oxidase

De las 79 posibles proteínas diana de NTRC identificadas en endospermo de semillas de arroz, 44 fueron identificadas mediante cromatografía de afinidad (36 si descartamos las identificadas de la elución con NaCl), 20 mediante inmunoprecipitación y las 15 restantes fueron identificadas mediante ambos métodos. Estas 15 proteínas, especificadas en la Tabla III.2.4., se convierten en firmes candidatas a ser proteínas diana de NTRC en endospermo al haber sido identificadas mediante dos aproximaciones diferentes.

Tabla III.2.4. Posibles dianas de NTRC en endospermo de semillas de arroz identificadas mediante cromatografía de afinidad e inmunoprecipitación

Para cada proteína identificada se especifica el número de identificación según la base de datos UniprotKB, el número de cisteínas conservadas en plantas (Cis), si ha sido previamente identificada como diana de tiorredoxinas (Trx) y su posible localización subcelular (C, citosol; CP, cloroplasto; AP, amiloplasto; P, plastidial; RE, retículo endoplasmático).

Proteína	UniprotKB ID	Cis	Trx	Posible localización
2-isopropylmalate synthase B, putative, expressed	Q2QXY9	7		CP
Actin-7, putative, expressed	Q67G20	4	●	C
ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit	Q7G065	7	●	CP/ AP/ C
ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit	P15280	4	●	CP/ AP/ C
Cytochrome P450 family protein	Q0DUT2	0		RE
Elongation factor EF-2	Q6H4L2	15	●	C
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic 3	Q6K5G8	2	●	C
Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein	P49027	7	●	C
HSP70, Dnak-type molecular chaperone Bip	Q6Z7B0	3	●	RE
Protein Brittle-1, chloroplastic/amyloplastic	Q6Z782	4	●	P
Pullulanase	P93416	2		CP/ AP
Pyruvate, phosphate dikinase 1, chloroplastic	Q6AVA8	8	●	CP
Starch branching enzyme 1	Q01401	3		CP/ AP
Starch branching enzyme 3	Q6H6P8	4	●	CP/ AP
Sucrose synthase 3	Q43009	3		C

III.2.2. Identificación de proteínas diana de NTRC en endospermo de semillas de trigo (*Triticum aestivum*)

La búsqueda de proteínas diana de NTRC en endospermo de semillas de cereales se completó con la realización de experimentos de identificación de sus posibles dianas en endospermo de semillas de trigo. En este caso, la búsqueda de posibles dianas de NTRC se realizó exclusivamente mediante experimentos de cromatografía de afinidad dado que, de los resultados obtenidos previamente en arroz, esta aproximación aportó el 75% de las proteínas identificadas. La metodología seguida en la cromatografía de afinidad fue similar a la utilizada en el caso de arroz eluyendo las proteínas unidas a NTRC en la columna en tres pasos sucesivos y utilizando esta vez el TCEP como único agente reductor para la elución de las posibles dianas. Los experimentos se realizaron a partir de endospermo de semillas de trigo en una fase de desarrollo comprendida entre los 9 y 11 días post-antesis (dpa) descascarilladas y desprovistas del pericarpo.

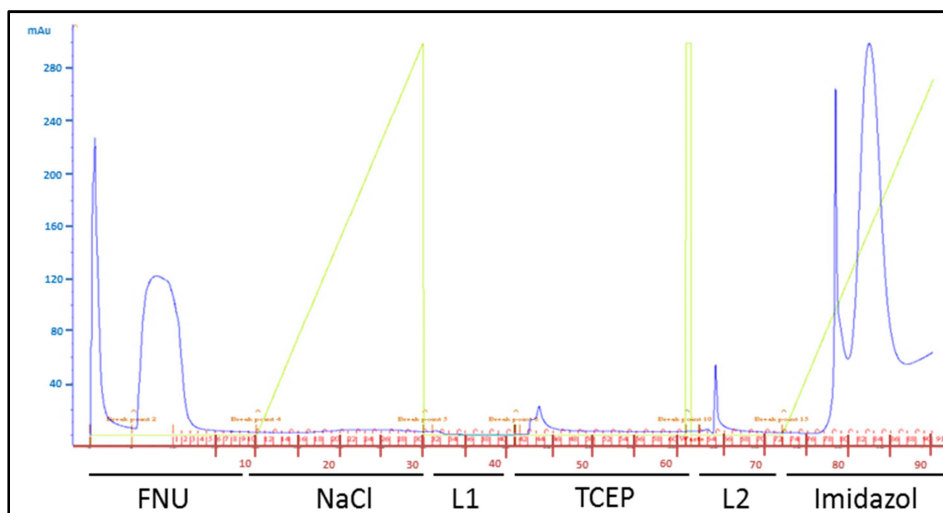


Figura III.2.7. Perfil de elución de la cromatografía de afinidad realizada con extractos de endospermo aislado de semillas de trigo en desarrollo

Perfil cromatográfico de las proteínas eluidas de la cromatografía de afinidad para la identificación de proteínas diana de NTRC de endospermo de semillas de trigo en desarrollo. La primera elución corresponde con la fracción proteica no unida a la columna (**FNU**). A continuación se realizó una elución con un gradiente de NaCl de 0 a 1 M (**NaCl**), seguido de una elución por reducción con 10 mM de TCEP (**TCEP**) y una elución con un gradiente de imidazol de 0 a 500 mM (**Imidazol**). Entre las eluciones con NaCl, TCEP e imidazol se realizaron lavados con tampón fosfato (**L1** y **L2**). En azul se representa la absorbancia (mAu) de las proteínas eluidas y en rojo las fracciones recogidas.

El perfil cromatográfico obtenido (Figura III.2.7) es muy similar al obtenido previamente con extractos de endospermo de arroz utilizando el agente reductor TCEP, observándose un pico de elución tras la aplicación del reductor y, posteriormente, con la aplicación de imidazol una mayor elución de proteínas debida principalmente al mutante de NTRC.

Las diferentes fracciones obtenidas en cada paso de la cromatografía se separaron mediante electroforesis (Figura III.2.8) para su posterior identificación mediante MALDI-TOF. Debido a la escasa cantidad de proteínas eluidas con NaCl tres fracciones consecutivas se analizaron conjuntamente.

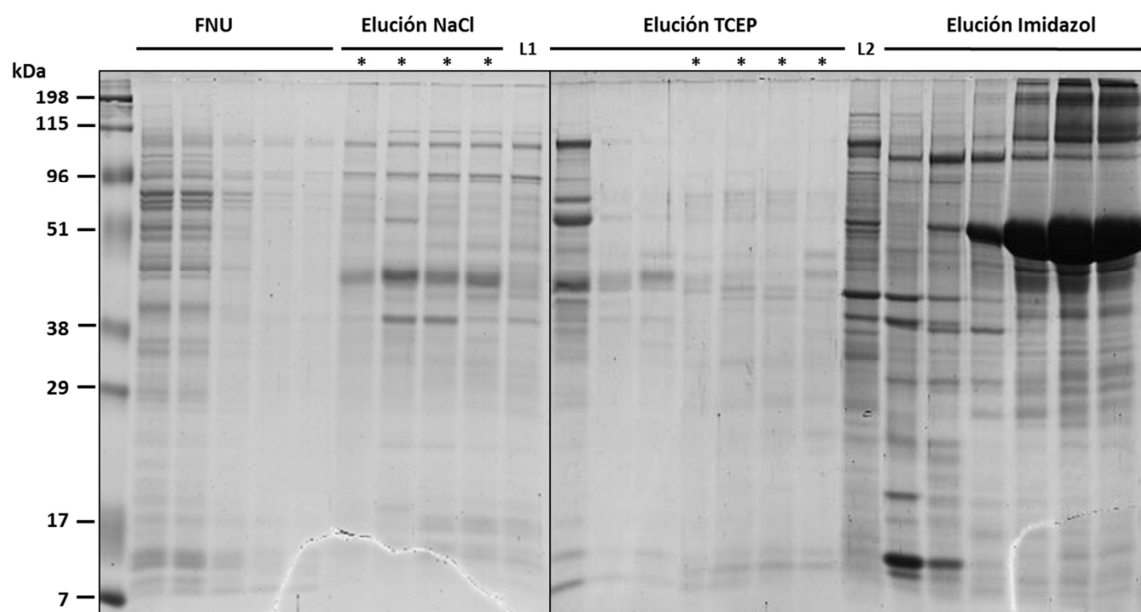


Figura III.2.8. Separación electroforética de de las proteínas eluidas mediante cromatografía de afinidad de endospermo de semillas de trigo

Las diferentes fracciones obtenidas de la cromatografía de afinidad para la identificación de proteínas diana de NTRC de endospermo de semillas de trigo se separaron mediante SDS-PAGE al 12%. El resultado se visualizó mediante tinción con azul de *Coomassie*. En cada carril se cargaron alícuotas de 100 μ L de las fracciones de proteína no unida (FNU) y lavados (L1 y L2), de 150 μ L de las fracciones de las eluciones con NaCl y TCEP precipitadas con TCA, y 70 μ L de las fracciones de las eluciones con imidazol. * indica tres fracciones consecutivas juntas. Los marcadores de peso molecular, en kDa, se indican a la izquierda.

En este caso sólo se tomaron muestras para su identificación de la elución con el agente reductor. Se analizaron un total de 110 muestras en las diferentes repeticiones del experimento, cuyo resultado fue la identificación de 35 proteínas diferentes, detalladas en la Tabla III.2.5, como posibles dianas de NTRC en endospermo de trigo. Dado que el trigo es un cereal cuyo genoma ha sido recientemente secuenciado, existen proteínas cuya secuencia completa no se encuentra disponible en la base de datos *UniprotKB*. A dichas proteínas se les asignó mediante comparación de secuencias el número de identificación de la proteína ortóloga más cercana. Para cada proteína se determinó el número de cisteínas conservadas, resultando que las 35 candidatas poseen al menos una cisteína conservada en su secuencia con la excepción de *Protein phosphatase 2C 10-like*, si bien posee hasta 4 cisteínas aunque no conservadas. Todas las proteínas aquí identificadas presentan por tanto residuos de cisteína capaces de formar puentes disulfuro, requisito necesario para poder ser considerada como posible proteína diana de NTRC. Así mismo, se comprobó si habían sido identificadas previamente como dianas de tiorredoxinas, algo que ocurre con más de la mitad de las candidatas. Por último se indica también la posible localización subcelular de cada proteína.

Tabla III.2.5. Posibles dianas de NTRC en endospermo de semillas de trigo identificadas mediante cromatografía de afinidad

Para cada proteína identificada se especifica el número de identificación según la base de datos UniprotKB, en caso de proteínas de trigo parcialmente secuenciadas se indica el número de identificación de la proteína ortóloga más cercana (*). Se indica también el número de cisteínas conservadas en ortólogos de plantas (Cis), si ha sido previamente identificada como diana de tioredoxinas (Trx) y su posible localización subcelular (C, citosol; CP, cloroplasto; AP, amiloplasto; P, plastidial; M, mitocondria; RE, retículo endoplasmático; L, lisosoma; G, aparato de Golgi; MC, microsomal; N, núcleo; MP, membrana plasmática; PC, pared celular).

Proteína	UniprotKB ID	Cis	Trx	Posible localización
ADP glucose pyrophosphorylase small subunit	P30523	4	●	CP/ P/ C
ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit	Q7XJA9	7	●	CP/ P/ C
Alpha-amylase inhibitor 0.19	Q4W0V7		●	C
Alpha-glucosidase like protein	A3BJ19*	8		CP/ AP
Beta amylase	P93594	2	●	CP/ AP
Beta-D-glucan exohydrolase	I1GNA2*	7		PC/ L
Beta-hexosaminidase subunit B2-like isoform 2	I1HMD4	6		MP
Clathrin heavy chain 1-like	I1INY7*	19		G
CytHSP70	I1H6Y3*	6	●	C
Elongation factor 1-alpha	Q03033	6	●	C
Elongation factor 2-like	I1IA29*	15	●	C
Endogenous alpha-amylase/subtilisin inhibitor	P16347	4	●	C
Glucose and ribitol dehydrogenase homolog	Q75KH3*	1	●	C
Glutathione transferase F1	Q8GTB7	3	●	C
Glutenin high molecular weight subunit	Q8H0L6	5		MC
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	C7C4X1	2	●	C
HSP70 molecular chaperone	I1HIQ7*	6	●	C
Lipoxygenase 2	I1GNI4*	1	●	CP/ C
NADPH-dependent thioredoxin reductase C	Q70G58*	5		CP/ AP
Phosphoenolpyruvate carboxylase	O82072	9	●	C
PISTILLATA-like MADS box protein (transcription factor WM14)	A9J1Y7	1		N
Protein disulfide isomerase 2 precursor	Q93XQ8	4	●	RE
Protein phosphatase 2C 10-like	I1HX80*	0		C
Putative carbonic anhydrase	P40880*	4	●	CP
Putative DNA damage binding protein 1	Q6L4S0*	18		N
Putative PPR protein (pentatricopeptide repeat domain)	Q6ZC60*	2		P/ M
Pyruvate orthophosphate dikinase, chloroplastic	Q6AVA8*	8	●	CP
Ribonuclease H2-C like	B6SMS5*	1		N
Starch branching enzyme IIa variant	P93691	4	●	CP/ AP
Sucrose phosphate synthase II 3A	I1I2Q2*	5		C
Sucrose synthase type 1	O82073	6	●	C
Sucrose synthase type 2	Q43223	4		C
Tri a Bd 27K	D2TE73	9		C
Ubiquitin-fold modifier-conjugating enzyme 1-like	I1IW69*	4		C
Xylanase inhibitor I	Q8H0K8	10		PC

En cuanto a su clasificación, las proteínas identificadas como posibles diana de NTRC de endospermo de semillas de trigo estarían participando en diferentes procesos celulares como son el metabolismo, la síntesis y degradación de proteínas, formando parte de la estructura celular, funcionando como proteínas de almacenamiento, de defensa, en el procesamiento del DNA y RNA o la homeostasis redox celular (Tabla III.2.6.). Al igual que en el caso de las proteínas identificadas de endospermo de semillas de arroz, el metabolismo, en particular el metabolismo del carbono, es el proceso celular que alberga un mayor número de posibles dianas de NTRC en este tejido, especializado en la síntesis y almacenamiento de almidón.

Tabla III.2.6. Clasificación de las posibles proteínas diana de NTRC identificadas de endospermo de trigo según su función

METABOLISMO

Metabolismo de carbohidratos

ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit
 ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit
 Alpha-amylase inhibitor 0.19
 Alpha-glucosidase like protein
 Beta amylase
 Beta-D-glucan exohydrolase
 Beta-hexosaminidase subunit B2-like isoform 2
 Endogenous alpha-amylase/subtilisin inhibitor
 Glucose and ribitol dehydrogenase homolog
 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
 Phosphoenolpyruvate carboxylase
 Putative carbonic anhydrase
 Pyruvate orthophosphate dikinase, chloroplastic like
 Starch branching enzyme IIa variant
 Sucrose phosphate synthase II 3A
 Sucrose synthase type 1
 Sucrose synthase type 2

Metabolismo de lípidos

Lipoxygenase 2

SÍNTESIS Y DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS

Traducción

Elongation factor 1-alpha
 Elongation factor 2-like
 PISTILLATA-like MADS box protein (transcription factor WM14)

Plegamiento

CytHSP70
 HSP70 molecular chaperone
 Protein disulfide isomerase 2 precursor

III. RESULTADOS

Modificación

Protein phosphatase 2C 10-like
Ubiquitin-fold modifier-conjugating enzyme 1-like

PROTEÍNAS DE ALMACENAMIENTO EN SEMILLAS

Tri a Bd 27K
Glutenin high molecular weight subunit

ESTRUCTURA CELULAR

Clathrin heavy chain 1-like

DEFENSA DE LA PLANTA

Xylanase inhibitor I

RESPUESTA A ESTRÉS

Glutathione transferase F1

PROCESAMIENTO DEL DNA Y RNA

Putative PPR protein (pentatricopeptide repeat domain)
Putative DNA damage binding protein 1
Ribonuclease H2-C like

HOMEOSTASIS REDOX CELULAR

NADPH-dependent thioredoxin reductase C

III.2.3. Comparación de los resultados de arroz y trigo

En endospermo de semillas de arroz se identificaron mediante dos técnicas complementarias 79 posibles dianas de NTRC, de las cuales 44 fueron identificadas mediante cromatografía de afinidad, 20 mediante inmunoprecipitación y 15 con ambas aproximaciones. En endospermo de semillas de trigo, utilizando exclusivamente la cromatografía de afinidad como herramienta de búsqueda de dianas de NTRC, se identificaron 35 proteínas, de las cuales 15 coinciden con las identificadas en endospermo de arroz, detalladas en la Tabla III.2.7. De estas, 8 habían sido identificadas en endospermo de arroz mediante las dos metodologías, confirmándose así dichas proteínas como posibles dianas de NTRC en endospermo.

Tabla III.2.7. Posibles proteínas diana de NTRC identificadas en común en endospermo de arroz y de trigo, clasificadas según su función

Las proteínas que han sido identificadas mediante cromatografía de afinidad e inmunoprecipitación en endospermo de semillas de arroz se indican con ®

METABOLISMO

Metabolismo del carbono

ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit®
 ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit®
 Alpha-amylase inhibitor family proteins
 Alpha-glucosidase like protein
 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase®
 Pyruvate phosphate dikinase, chloroplastic®
 Starch branching enzyme®
 Sucrose synthase®

SÍNTESIS Y DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS

Traducción

Elongation factor EF-1
 Elongation factor EF-2®

Plegamiento

HSP70 cytosolic
 HSP70 molecular chaperone®

DEFENSA DE LA PLANTA

Xylanase inhibitor

PROCESAMIENTO DEL DNA Y RNA

Putative pentatricopeptide

HOMEOSTASIS REDOX CELULAR

NADPH-dependent thioredoxin reductase C

III.3. CARACTERIZACIÓN DE TRES ISOFORMAS DE SACAROSA SINTASA DE ARROZ

La sacarosa, principal fuente de carbono producida por la fotosíntesis, se sintetiza en las hojas y es transportada por el floema hasta los diferentes tejidos heterotróficos de la planta, como tubérculos, semillas o nódulos radiculares, entre otros. En ellos la sacarosa sintasa (SUS) cataliza la rotura reversible del disacárido en UDPG y fructosa, suministrando sustratos para el crecimiento de dichos tejidos. El hecho de haber identificado tres isoformas de SUS como posibles proteínas diana de NTRC en endospermo de cereales, sugiere una posible modulación redox de la actividad de esta enzima mediada por NTRC en este tejido.

En este trabajo hemos abordado esta posibilidad mediante estudios *in vitro* de la actividad SUS de arroz.

III.3.1. Análisis del patrón de expresión de los genes *Sus1*, *Sus2* y *Sus3* durante el desarrollo de las semillas de arroz

La familia génica de SUS en arroz, al igual que en la mayoría de plantas analizadas, está compuesta por múltiples genes. En concreto se compone de siete genes (*OsSus1-7*), aunque el séptimo gen identificado, *OsSus7*, posee una secuencia idéntica a *OsSus5* excepto en 9 nucleótidos y se sospecha que es el resultado de la duplicación de una región cromosómica (Cho et al., 2011).

La estructura génica de los genes *Sus* se encuentra muy conservada entre los miembros de una misma familia, así como entre diferentes especies. Los genes *Sus* están constituidos por 14 o 15 exones de tamaño similar y codifican mRNAs de un tamaño alrededor de 2,7 kb que dan lugar a proteínas de unos 800 aminoácidos. El número y distribución de los exones e intrones en estos genes es constante, salvo algunos casos en los que disminuye el número de exones debido a la desaparición de uno o varios intrones, produciéndose generalmente la fusión de exones de dos en dos. Especial es el caso de las isoformas *OsSUS5*, *OsSUS6* y *OsSUS7* en arroz y *AtSUS5* y *AtSUS6* en *Arabidopsis*, que poseen una extensión carboxi-terminal debida bien a la posesión de un exón final de mayor longitud o de exones adicionales (Figura III.3.1)(Cho et al., 2011; Chen et al., 2012).

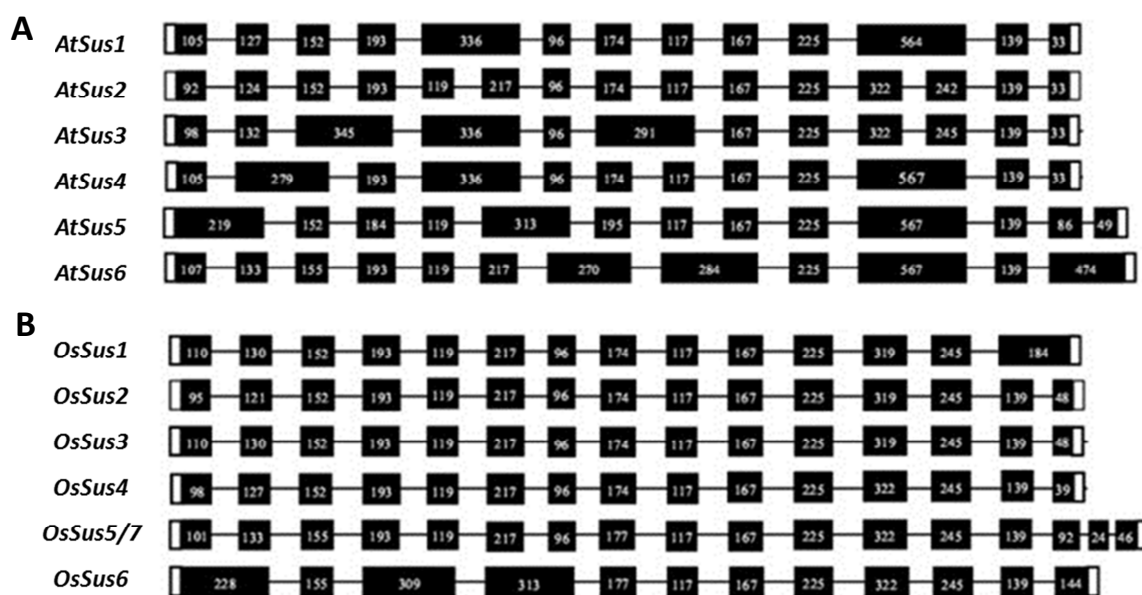


Figura II.3.2. Organización estructural de los exones e intrones de los genes *Sus* de *Arabidopsis* y arroz

Estructura exón/intrón de los genes *AtSUS1-6* y *OsSus1-7* de *Arabidopsis* (A) y arroz (B), respectivamente. Las cajas negras indican exones con regiones codificantes y las líneas que los conectan representan los intrones. Los números de los cuadros negros representan el tamaño (pb) de los correspondientes exones. Las regiones no codificantes de los extremos 5' y 3' (UTRs) se representan con cuadros en blanco. Para resaltar la conservación de la estructura de los exones, los tamaños de los exones, intrones y UTRs no se representan. Figura adaptada de (Chen et al., 2012).

Del análisis filogenético de las secuencias aminoacídicas de las diferentes isoformas SUS existentes en plantas surgió una clasificación que divide a las proteínas SUS en tres grupos denominados SUSI, SUSII (también denominado SUSA) y SUSIII (Komatsu et al., 2002). Los diferentes grupos se componen de proteínas SUS tanto de plantas dicotiledóneas como de monocotiledóneas, indicando que la divergencia evolutiva de los genes *Sus* ocurrió antes que la separación entre dicotiledóneas y monocotiledóneas. Además, el grupo I se subdivide en dos subgrupos, uno constituido por proteínas SUS específicas de dicotiledóneas y el otro por proteínas SUS específicas de monocotiledóneas en el que a su vez se diferencian dos ramas, indicando que un ancestro de los genes *Sus* se diversificó previamente a la especiación de las gramíneas (Chen et al., 2012). Un ejemplo de la clasificación de proteínas SUS en los diferentes grupos se representa en la figura III.3.2., donde se puede observar que la familia SUS de arroz aparece distribuida en los tres grupos. Las isoformas OsSUS1, OsSUS2 y OsSUS3 pertenecen al mismo grupo I de monocotiledóneas, sin embargo OsSUS1 se encuentra filogenéticamente separada a OsSUS2 y OsSUS3 localizándose en una rama diferente a estas. En el grupo III se encuentran las isoformas OsSUS5 y OsSUS6 poseedoras, al igual que las isoformas AtSUS5 y AtSUS6 de *Arabidopsis*, de la extensión carboxi-terminal carentes en las isoformas pertenecientes a otros grupos.

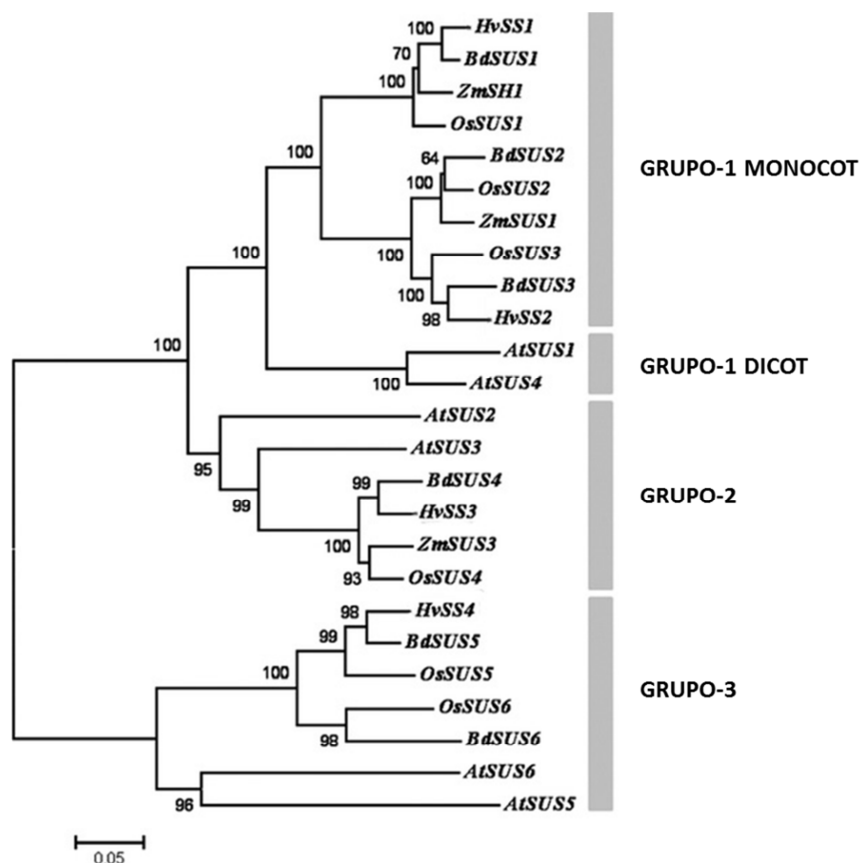


Figura III.3.2. Árbol filogenético de las secuencias aminoacídicas derivadas de los genes *Sus* de cereales

Los datos de las SUS de *Arabidopsis* se incluyeron para la comparación con una especie dicotiledónea. Los números de acceso de las CDS son: (1) *Hordeum vulgare*, HvSS1, X65871; HvSS2, X69931; HvSS3, AK249450; HvSS4, AK251329; (2) *Zea mays*, ZmSh1, X02400; ZmSUS1, L22296; ZmSUS3, AY124703; (3) *Oryza sativa*, OsSUS1, AK100334; OsSUS2, AK072074; OsSUS3, AK100306; OsSUS4, AK102158; OsSUS5, AK063304; OsSUS6, AK065549; (4) *Brachypodium distachyon*, Bradi1g46670.1, BdSUS1; Bradi1g60320.1, BdSUS2; Bradi1g20890, BdSUS3; Bradi1g62960.1, BdSUS4; Bradi1g29570, BdSUS5; Bradi3g60690, BdSUS6; (5) *Arabidopsis thaliana*, AtSUS1, X70990; AtSUS2, Q00917; AtSUS3, AL161494; AtSUS4, AL353871; AtSUS5, BAB11375; AtSUS6, AAG30975. Los valores de *Bootstrap* se representan como porcentajes. Figura adaptada de (Barrero-Sicilia et al., 2011).

Nos hemos centrado en este estudio en los genes *OsSus1*, *OsSus2* y *OsSus3* que codifican las isoformas SUS1, SUS2 y SUS3 identificadas como posibles dianas de NTRC.

El estudio del patrón de expresión de los genes *OsSus1*, *OsSus2* y *OsSus3* en endospermo de semillas de arroz se llevó a cabo mediante PCR a tiempo real (qPCR), utilizando muestras de RNA total procedentes de semillas en diferentes fases del desarrollo (según se describe en el apartado II.1.2 de Materiales y métodos). Con el fin de comparar los niveles de transcrito en este tejido con los existentes en tejido fotosintético, también se analizó la expresión de los diferentes genes en muestras de hojas de plantas adultas. Se utilizaron parejas de oligonucleótidos capaces de discernir los tres genes *Sus* de arroz estudiados, así como el gen de la *poliubiquitina* de arroz (*OsUbi*) de expresión constitutiva, utilizado como referencia (ver Tabla II.3. de Materiales y métodos). En la Figura III.3.3 se representan los

niveles de mRNA de los tres genes *OsSus* normalizados respecto a los niveles de transcrito del gen de la *poliubiquitina*.

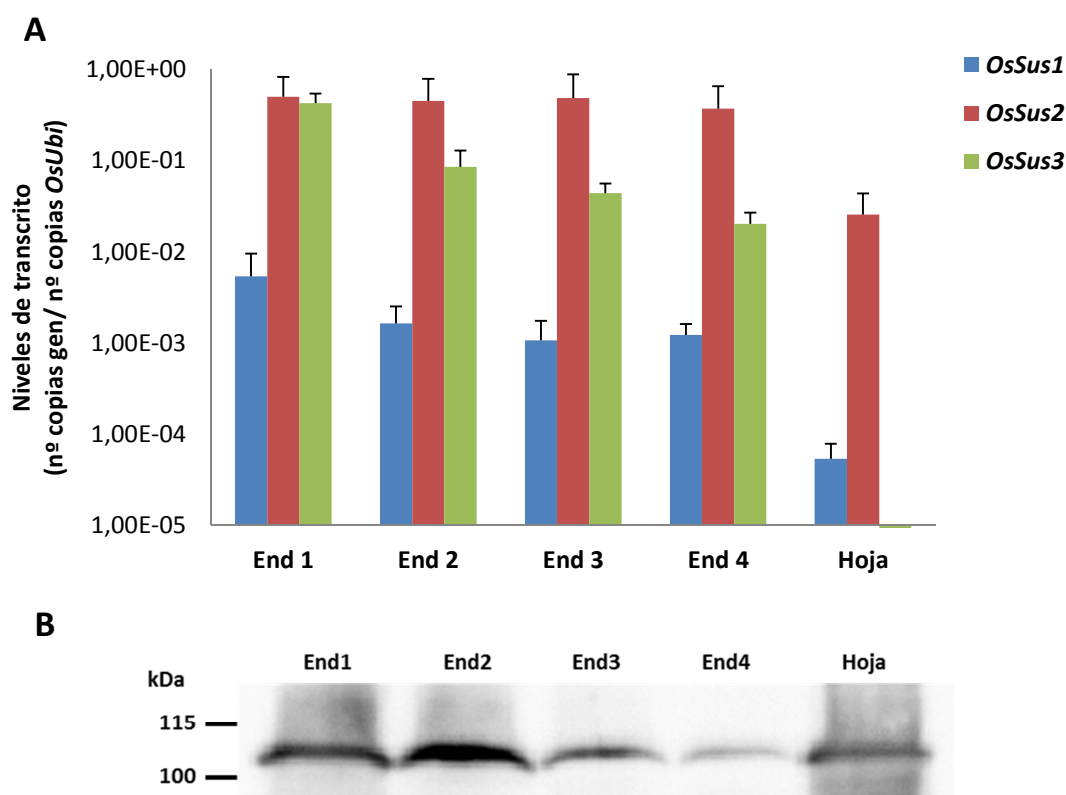


Figura III.3.3. Expresión de los genes *OsSus1*, *OsSus2* y *OsSus3* en semillas de arroz en desarrollo

(A) Se determinaron mediante qPCR los niveles de mRNA de los genes *OsSus1*, *OsSus2* y *OsSus3* en semillas de arroz en cada uno de los estadios de desarrollo establecidos (End1 a End4) y en hojas de planta adulta. En cada caso se utilizaron 50 ng del cDNA sintetizado a partir del RNA total aislado en las diferentes muestras. Los resultados se muestran en relación a los niveles de mRNA de la poliubiquitina (*OsUbi*) en cada muestra. (B) Análisis de la presencia de las proteínas SUS en las diferentes muestras mediante *Western blot* con un anticuerpo anti-SUS. Se utilizaron extractos totales de proteínas de endospermo de semillas de arroz en cada estadio de desarrollo y de hoja (40 µg de proteína) en condiciones reductoras (tampones de extracción y de carga suplementados con βME 14 mM y DTT 10 mM). Los marcadores de peso molecular, en kDa, se indican a la izquierda.

Los tres genes *OsSus* analizados presentaron elevados niveles de expresión en endospermo durante todo el desarrollo de la semilla, siendo constantes y mayores en el caso de *OsSus2* y decrecientes tanto para *OsSus1* como *OsSus3*, cuyos niveles de transcritos disminuían hasta un orden de magnitud al final del desarrollo. Los niveles de expresión de *OsSus1* fueron los más bajos durante todo el desarrollo la semilla en comparación con la expresión de *OsSus2* y *OsSus3*, si bien este gen ha sido descrito junto con *OsSus3* como gen de expresión predominante en semillas en desarrollo (Huang et al., 1996; Wang et al., 1999). En hoja los niveles de transcritos de los genes *OsSus* fueron menores que en endospermo, siendo prácticamente inexistente la expresión de *OsSus3* en este tejido.

El análisis *Western blot* mostró la presencia de la proteína, probablemente una mezcla de isoformas SUS igualmente detectadas por el anticuerpo, a lo largo del desarrollo de la semilla, siendo más abundante en los estadíos iniciales (Figura III.3.3). El contenido de proteína SUS se corresponde por tanto con los niveles totales de expresión de los genes *Sus* durante el desarrollo de la semilla de arroz.

III.3.1.1. Expresión de los genes *Sus* de arroz en condiciones de estrés abiótico

Los cereales en general soportan elevadas temperaturas durante el periodo de espigado y formación de la semilla. En el caso particular del arroz analizado en este trabajo, ha sido cultivado en la marisma del Guadalquivir, por tanto, con cierto grado de salinidad. El estrés salino supone un problema aún más acuciante en periodo de sequía, que deriva en un estrés oxidativo que se suma los anteriores. Dado el importante papel que juega la SUS en el control de la sacarosa importada en tejidos no fotosintéticos, como las semillas de cereales, esta enzima se encuentra altamente regulada. Entre los factores descritos como moduladores de la expresión de los genes *Sus* se encuentran los estreses provocados por frío y sequía, que derivan en un estrés osmótico generado por el incremento de los niveles endógenos de azúcares (Dejardin et al., 1999).

En este trabajo se planteó la posibilidad de que la expresión de los genes *Sus* estuviera alterada durante el desarrollo de las semillas de arroz como consecuencia del estrés salino. Para ello se llevó a cabo un estudio de la expresión de los genes *OsSus1*, *OsSus2* y *OsSus3* mediante PCR a tiempo real (qPCR) durante el desarrollo de semillas de plantas de arroz cultivadas en condiciones de alta salinidad (Apartado II.1.2 de Materiales y métodos) y se compararon con los datos obtenidos en condiciones de baja salinidad.

La Figura III.3.4 muestra que las condiciones de alta salinidad no influyen en los niveles de expresión de los genes *OsSus* estudiados. Realizando un análisis estadístico *T-student* de las parejas de datos, encontramos que tan solo existe un caso donde la variación del nivel de expresión entre las muestras con y sin tratamiento de salinidad es significativa para $\alpha=0,05$. Se trata de la expresión del gen *OsSus3* en el primer estadío de desarrollo de la semilla donde los niveles de transcrito disminuyen hasta un 64%.

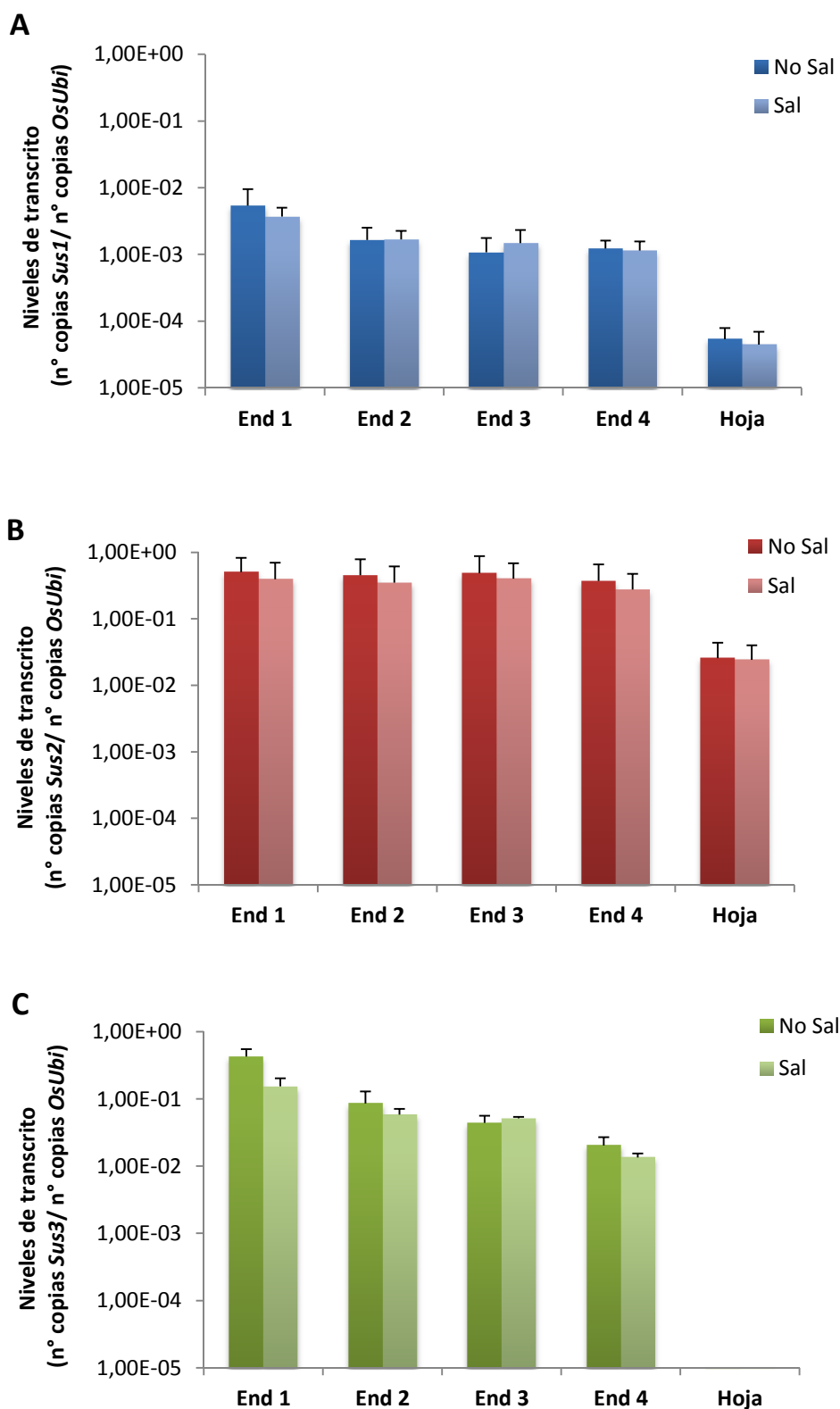


Figura III.3.4. Efecto de la salinidad sobre la expresión de los genes *OsSus1*, *OsSus2* y *OsSus3* de semillas de arroz
Se determinaron los niveles de mRNA de los genes *OsSus1* (A), *OsSus2* (B) y *OsSus3* (C) mediante qPCR en semillas de arroz en cada uno de los estadios de desarrollo establecidos (End1 a End4) y hojas de plantas cultivadas en condiciones de baja salinidad (No Sal) y en condiciones de alta salinidad (suplemento de 2,5 g/L de NaCl en el agua de riego) (Sal). En cada caso se utilizaron 50 ng del cDNA sintetizado a partir del RNA total aislado en las diferentes muestras. Los resultados se muestran en relación a los niveles de mRNA de la poliubiquitina (*OsUbi*) en cada muestra.

III.3.2. Clonación de los cDNAs de SUS de arroz para su expresión en *E. coli*

La disponibilidad de la secuencia completa del genoma del arroz permitió la clonación de los cDNAs correspondientes a los genes *OsSus1*, *OsSus2* y *OsSus3* codificantes de las proteínas OsSUS1, OsSUS2 y OsSUS3, respectivamente, que fueron previamente identificadas como posibles dianas de NTRC en endospermo de arroz.

Para la clonación de los cDNAs de las tres isoformas de SUS de arroz se diseñaron oligonucleótidos (Tabla III.3.1) a partir de las secuencias de cDNAs disponibles en la base de datos *Knowledge-based Oryza Molecular biological Encyclopedia* (KOME). Según esta base de datos y programas de predicción de localización subcelular como Predotar (<http://urgi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html>), la isoforma OsSUS2 podría tener localización mitocondrial, aunque otros programas de predicción como *SignalP* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) le asignan una localización citosólica. Por este motivo, se diseñó además una pareja de oligonucleótidos (Tabla III.3.1) que permite la clonación del cDNA para la expresión de la proteína madura correspondiente a OsSUS2 sin el posible péptido tránsito a la mitocondria, que constaría según los programas de predicción de 28 aminoácidos del extremo N-terminal. Todos los oligonucleótidos se diseñaron además con las secuencias de corte de enzimas de restricción (*Bam*HI para los cebadores del extremo 5' y *Hind*III para los cebadores del extremo 3') que permitían su posterior clonación en el vector de expresión pQE30.

Tabla III.3.1. Detalles de oligonucleótidos utilizados y tamaño de los cDNAs clonados; y número de residuos, peso molecular y punto isoeléctrico de las proteínas resultantes de la clonación en el vector pQE30.

	Oligonucleótidos	cDNA (pb)	Proteína (aa)	MW (kDa)	PI
OsSUS1	SUS1 BamHI Fw/ SUS1 HindIII Rv	2467	828	94,3	6,1
OsSUS2	SUS2 BamHI Fw/ SUS2 HindIII Rv	2443	820	93,5	6.1
OsSUS2-pt	SUS2-pt BamHI Fw/ SUS2 HindIII Rv	2359	792	90,5	6.0
OsSUS3	SUS3 BamHI Fw/ SUS3 HindIII Rv	2467	828	94,5	6.3

La base de datos KOME describe que los genes de las diferentes isoformas de SUS presentan un patrón diferencial de expresión dependiendo del tejido y del estado de desarrollo de la planta. Por este motivo, la amplificación de los cDNAs se llevó a cabo por RT-PCR a partir de diferentes preparaciones de RNA de arroz (var. Nipponbare) según la isoforma de SUS que se pretendía clonar. De este modo, se utilizó una preparación de RNA total aislado

de raíz de plántulas de arroz germinadas en placa para la clonación de OsSUS1, de hojas de plantas adultas de arroz para la clonación de OsSUS2 y de endospermo de semillas de arroz en un estadio intermedio de su desarrollo para la clonación de OsSUS3.

Los cDNAs obtenidos a partir de los oligonucleótidos diseñados fueron clonados en el vector pGEMt *easy*. Las secuencias se comprobaron mediante secuenciación utilizando los oligonucleótidos correspondientes a los sitios T7 y M13 presentes en el vector pGEMt *easy* y una pareja de oligonucleótidos internos comunes para las tres isoformas que se diseñaron en regiones conservadas de los tres genes (SUS Int Fw -5'TGGAGAAGGGTTGGGGTG3'- y SUS Int Rw -5'CATCTTCTTGAACCTCAGCCTG3'-). Una vez confirmadas las secuencias, los cDNAs se clonaron en el vector de expresión pQE30. Dicho vector añade a las proteínas una cola de 6 residuos de histidina en su extremo N-terminal, que permitirán la posterior purificación mediante cromatografía de afinidad por Níquel. El tamaño final, peso molecular y punto isoeléctrico de las proteínas resultantes esperables de estas clonaciones se detalla en la Tabla III.3.1.

III.3.3. Pruebas de expresión de las SUS de arroz en *E. coli*

Para comprobar la expresión de las proteínas en *E.coli* se transformaron las estirpes BL21 y XL1-Blue con los plásmidos generados: pQE30-OsSUS1, pQE30-OsSUS2, pQE30-OsSUS2-pt y pQE30-OsSUS3. La inducción de la expresión de las diferentes proteínas se realizó mediante la adición de 1 mM de IPTG a cultivos de estas cepas a 37°C y se recogieron alícuotas a diferentes tiempos para la determinación del tiempo óptimo de inducción de las proteínas. Las alícuotas recogidas se lisaron separando posteriormente la fracción soluble de la membranosa y se analizaron mediante SDS-PAGE. Mediante tinción de los geles de acrilamida con Azul de *Coomassie* no se apreció la inducción en ningún caso. Se repitieron las pruebas de expresión con dos temperaturas diferentes, 30°C y 20°C. La tinción con azul de *Coomassie* de los geles de acrilamida tampoco reveló inducción de las proteínas recombinantes (Figura III.3.5).

Para confirmar la falta de expresión se analizaron las muestras mediante *Western blot* con un anticuerpo anti-poliHis que reconocería el fragmento de 6 histidinas añadido a las proteínas clonadas en el vector pQE30. Este análisis corroboró la ausencia de las proteínas recombinantes en las diferentes condiciones de inducción ensayadas, si bien el anticuerpo reconocía una proteína de unos 37 kDa en todos los casos (Figura III.3.5).

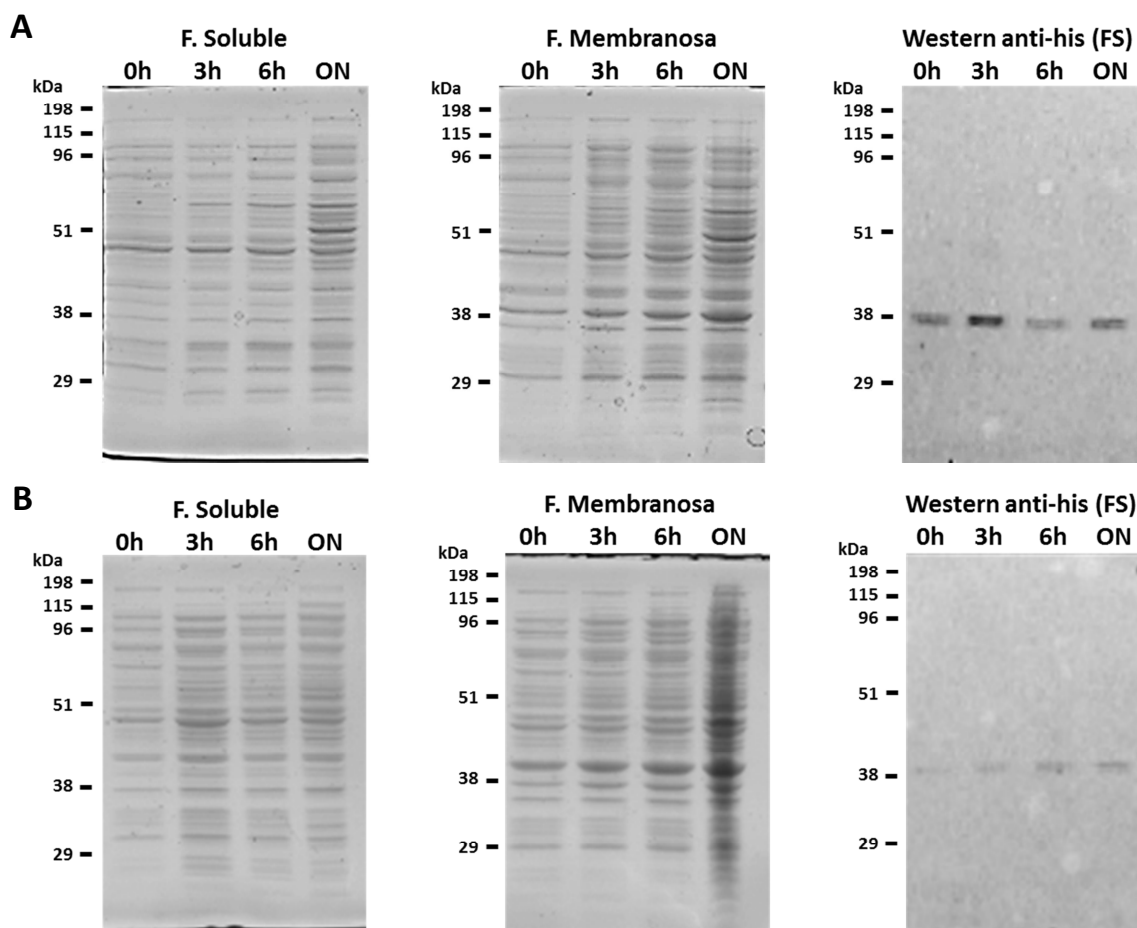


Figura III.3.5. Prueba de expresión de OsSUS3 en las estirpes de *E. coli* XL1-Blue y BL21 a 20°C

Las cepas de *E. coli* XL1-Blue (**A**) y BL21 (**B**) transformadas con la construcción pQE30-OsSUS3 se cultivaron en medio líquido LB hasta alcanzar una $DO_{600} \approx 0,5$, se indujeron con 1 mM de IPTG y se incubaron a 20 °C toda la noche. Se tomaron muestras de 1 mL antes de la inducción con IPTG (**0h**), a las 3 horas (**3h**), a las 6 horas (**6h**) y tras una noche de incubación (**ON**). Alícuotas de los extractos crudos recogidos (15 µg de proteína) se analizaron en geles de acrilamida al 10% en condiciones reductoras y se tiñeron con Azul de Coomassie o se analizaron mediante *Western blot* con un anticuerpo anti-poliHis. Se analizaron las fracciones soluble y membranosa, según se indica. Los marcadores de peso molecular, en kDa, se indican a la izquierda.

III.3.4. Clonación de los cDNAs de SUS de arroz para la expresión en *N. benthamiana*

Ante la imposibilidad de la expresión de las isoformas de SUS de arroz en bacterias, se planteó un abordaje diferente para tratar de producirlas. Se trata de la expresión transitoria de proteínas heterólogas en hojas de la planta modelo *Nicotiana benthamiana*, de acuerdo con la metodología ya descrita por He y colaboradores (He et al., 2004). Este nuevo abordaje requería la utilización de un sistema binario de expresión y por tanto una nueva estrategia de clonación basada en la metodología *Gateway*® para la clonación de los cDNAs en los vectores binarios de expresión pGWB.

Del mismo modo que para la clonación de los cDNAs de SUS de arroz para la expresión en *E. coli*, se diseñaron oligonucleótidos específicos (Tabla III.3.2) que permitieron la clonación

de las secuencias codificantes de los genes *OsSus1*, *OsSus2* y *OsSus3*. Aunque en este caso, la utilización del sistema de clonación *Gateway*® requería que los oligonucleótidos diseñados, a parte de la secuencia específica del gen, poseyeran los sitios de recombinación AttB1 y AttB2 en los cebadores 5' y 3', respectivamente. De igual forma, se diseñó una pareja de oligonucleótidos que permitía la amplificación de la isoforma OsSUS2 sin el posible péptido tránsito a la mitocondria.

El procedimiento para la amplificación de los cDNAs fue similar al realizado para la expresión en *E. coli*, mediante RT-PCR utilizando diferentes extracciones de RNA según la isoforma a clonar (Véase apartado III.3.2). Los cDNAs amplificados con los cebadores diseñados se clonaron en el vector pDONR 207 y se comprobaron mediante secuenciación utilizando oligonucleótidos diseñados específicamente para el vector pDONR 207 y una pareja de oligonucleótidos internos comunes para las tres isoformas diseñada en regiones conservadas de los tres genes (SUS Int Fw -5'TGGAGAAGGGTTGGGGTG3'- y SUS Int Rw -5'CATCTTCTTGAACCTCAGCCTG3'-).

Una vez comprobadas las secuencias, los cDNAs se clonaron en los vectores binarios de expresión pGWB8 y pGWB9 que añaden a las proteínas maduras una cola de 6 residuos de histidina, en los extremos C-terminal y N-terminal, respectivamente. El tamaño final, peso molecular y punto isoelectrico de las proteínas resultantes de estas clonaciones se detalla en la Tabla III.3.2.

Tabla III.3.2. Detalles de oligonucleótidos utilizados y tamaño de los cDNAs clonados; y número de residuos, peso molecular y punto isoelectrico de las proteínas resultantes de la clonación en los vectores pGWB8 y pGWB9.

	Oligonucleótidos	cDNA (pb)	Proteína (aa)	MW (kDa)	PI
pGWB8-OsSU1	AttB1 SUS1/ AttB2 SUS1	2502	825	95,2	6,07
pGWB9-OsSU1			847	96,5	6,20
pGWB8-OsSU2	AttB1 SUS2/ AttB2 SUS2	2478	827	94,4	6,09
pGWB9-OsSU2			839	95,7	6,24
pGWB8-OsSU2-pt	AttB1 SUS2-pt/ AttB2 SU2	2397	800	91,5	5,96
pGWB9-OsSU2-pt			812	92,7	6,10
pGWB8-OsSU3	AttB1 SUS3/ AttB2 SUS3	2502	835	95,4	6,25
pGWB9-OsSU3			847	96,7	6,39

III.3.5. Expresión de las SUS de arroz en *N. benthamiana*

Para llevar a cabo la expresión en *Nicotiana benthamiana*, se transformó previamente la cepa C58C1 de *Agrobacterium tumefaciens* con las construcciones OsSUS1, OsSUS2, OsSUS2-pt y OsSUS3 clonadas en los vectores pGWB8 y pGWB9. En primer lugar se comprobó la producción de las proteínas a partir de las diferentes construcciones generadas con ambos vectores. Para ello se infiltraron plantas de *N. benthamiana* adultas con las cepas de *Agrobacterium* conteniendo las diferentes construcciones. Los extractos de hojas recogidas a los dos días tras la agroinfiltración se compararon mediante *Western blot* con un anticuerpo anti-poliHis. Este análisis indicó que sólo se producían las proteínas recombinantes a partir del vector pGWB9 (Figura III.3.6), que añade la cola de 6 histidinas en el extremo N-terminal. Los sucesivos experimentos se realizaron por tanto exclusivamente con las construcciones realizadas en este vector. El análisis *Western blot* reveló además que las diferentes isoformas de SUS mostraban una movilidad electroforética ligeramente inferior a la esperada.

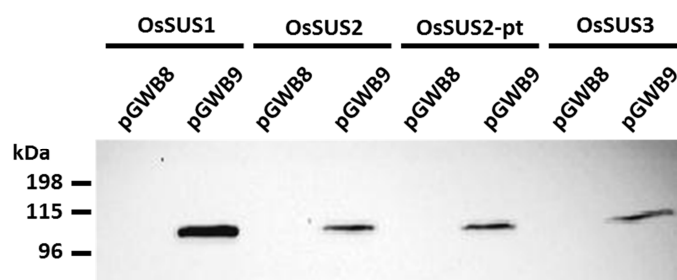


Figura III.3.6. Expresión en *N. benthamiana* de las isoformas OsSUS clonadas en los vectores pGWB8 y pGWB9

Se infiltraron hojas de *N. benthamiana* con cultivos de *Agrobacterium* transformadas con las construcciones OsSUS1, OsSUS2, OsSUS2-pt y OsSUS3 clonadas en los vectores pGWB8 y pGWB9. Alícuotas (50 µg de proteína) de los extractos crudos de hojas recogidas tras dos días de la agroinfiltración se analizaron en geles de acrilamida al 10% en condiciones reductoras. El resultado se analizó mediante *Western blot* con un anticuerpo anti-poliHis. Los marcadores de peso molecular, en kDa, se indican a la izquierda.

El siguiente parámetro que se determinó fue el tiempo necesario tras la agroinfiltración para conseguir la máxima expresión de cada una de las isoformas. Se observó que eran necesarios al menos dos días tras la infiltración con las cepas de *Agrobacterium* para que la planta comience a producir las proteínas recombinantes en cantidades apreciables. A continuación, se recogieron para cada isoforma muestras a los 2, 3 y 6 días posteriores a la agroinfiltración. El análisis mediante *Western blot* de los extractos crudos obtenidos de las diferentes muestras recolectadas (Figura III.3.7) mostró una diferente cinética de expresión para cada isoforma. Las isoformas 1 y 2 (con y sin péptido de tránsito) alcanzaron la máxima producción a los 6 días tras la infiltración, si bien, la cantidad de OsSUS1 era notablemente mayor que la de OsSUS2(-pt) en los diferentes días analizados. La isoforma OsSUS3 en cambio

alcanzó la máxima producción a los 2 días tras la infiltración, disminuyendo en los días sucesivos los niveles de proteína. Por tanto, la recolección del material vegetal para la preparación de los extractos crudos se estableció en 6 días tras la agroinfiltración en el caso de las isoformas OsSUS1 y OsSUS2(-pt) y en 2 días tras la agroinfiltración en el caso de OsSUS3.

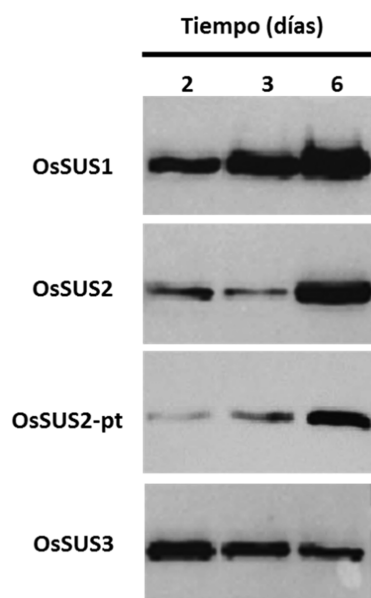


Figura III.3.7. Patrón de expresión de las isoformas OsSUS en *N. benthamiana* tras la agroinfiltración

Plantas de *N. benthamiana* fueron infiltradas con cultivos de *Agrobacterium* transformados con las construcciones OsSUS1, OsSUS2, OsSUS2-pt y OsSUS3 clonadas en el vector pGWB9. Alícuotas (50 µg de proteína) de los extractos crudos de las hojas de *N. benthamiana* recogidas a los dos, tres y seis días tras la agroinfiltración se analizaron en geles de acrilamida al 8% en condiciones reductoras. El resultado se analizó mediante *Western blot* con un anticuerpo anti-poliHis

III.3.6. Purificación de las isoformas OsSUS1, OsSUS2 y OsSUS3

La purificación de las diferentes isoformas de SUS recombinantes de arroz expresadas en *N. benthamiana* se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad por Níquel (ver Materiales y métodos) a partir de la fracción soluble obtenida de extractos crudos de las hojas agroinfiltradas. El tampón de extracción utilizado para la preparación de los extractos crudos se elaboró siguiendo las siguientes pautas: una solución tampón a pH neutro que sería la misma para los posteriores ensayos de actividad (50 mM HEPES/KOH pH 7,0), fuerza iónica que evite interacciones electrostáticas inespecíficas con la fase estacionaria durante la cromatografía (150 mM KCl), sacarosa que favorece una conformación de la misma más estable para su purificación (150 mM sacarosa), inhibidores de proteasas de plantas (1 mM PMSF y una mezcla de inhibidores de proteasas) y una pequeña cantidad de glicerol para aportar más estabilidad a las proteínas purificadas en solución (10% (v/v) glicerol). La necesidad de la presencia de agentes reductores en el tampón de extracción fue una cuestión

importante a la hora de decidir la composición de dicho tampón. Como estaba descrito que la SUS puede variar su actividad dependiendo de su estado redox (Pontis et al., 1981; Rohrig et al., 2004; Marino et al., 2008), se planteó la posibilidad de usar un tampón de extracción sin agentes reductores que permitiese la purificación de la enzima en un estado oxidado con el objetivo de la futura realización de ensayos de actividad dependientes de reducción. Se realizaron varios intentos de purificación de las diferentes proteínas recombinantes de arroz a partir de extractos realizados con el tampón anteriormente descrito pero no se consiguió en ningún caso SUS recombinante. Durante la elución con imidazol, la proteína despegada de la matriz formaba visibles agregados siendo imposible su posterior disolución. Se analizó a continuación si la imposibilidad de purificar las isoformas SUS en su forma nativa se debía a la ausencia de agentes reductores en el tampón de extracción. Para ello se llevó a cabo la purificación en paralelo de dos extractos crudos de la misma muestra de *N. benthamiana* expresando OsSUS2, uno con el tampón de extracción anteriormente descrito y otro conteniendo además DTT 5 mM. Se pudo comprobar mediante tinción con azul de *Coomassie* de geles de acrilamida y por *Western blot* con anticuerpo anti-poliHis que la presencia de agentes reductores durante la extracción era fundamental para la purificación de OsSUS2, ya que se obtuvo una muestra de enzima parcialmente purificada correspondiente a la proteína recombinante en su forma nativa (Figura III.3.8).

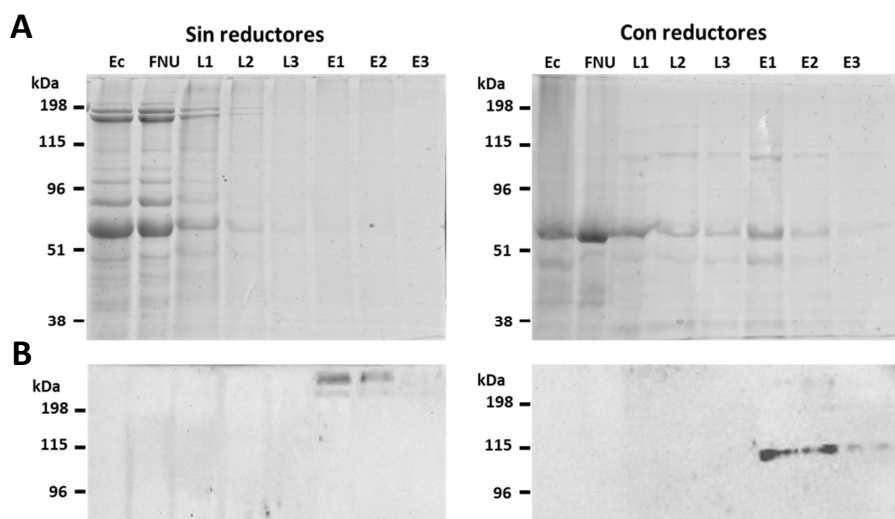


Figura III.3.8. Purificación de OsSUS2 sobreexpresada en *N. benthamiana*

Extractos crudos obtenidos de 2,5 g de hojas de *N. benthamiana* infiltradas con cultivos de *Agrobacterium* transformadas con la construcción pGWB9-OsSUS2 se utilizaron para la purificación de OsSUS2 mediante cromatografía de afinidad por níquel. En un caso los extractos proteicos se realizaron en condiciones no reductoras y en otro en condiciones reductoras con DTT 5 mM en el tampón de extracción, según se indica. Alícuotas de las fracciones obtenidas en cada paso de la purificación (50 μ L de Ec y FNU y 100 μ L de cada lavado y elución) se analizaron en geles de acrilamida al 8% en condiciones reductoras. El resultado de la purificación se observó mediante tinción de los geles con Azul de *Coomassie* (A) y mediante *Western blot* con anti-poliHis (B). Ec, extracto crudo; FNU, fracción no unida; L1, L2 y L3, lavados; E1, E2 y E3, eluciones.

Las sucesivas extracciones de proteínas se realizaron siempre en condiciones reductoras, tanto para la OsSUS2 como para el resto de isoformas. Para asegurar condiciones reductoras durante todo el proceso de purificación, los tampones de lavado y elución se suplementaron con 2 mM DTT. De este modo se consiguieron fracciones parcialmente purificadas de las isoformas de SUS de arroz (Figura III.3.9).

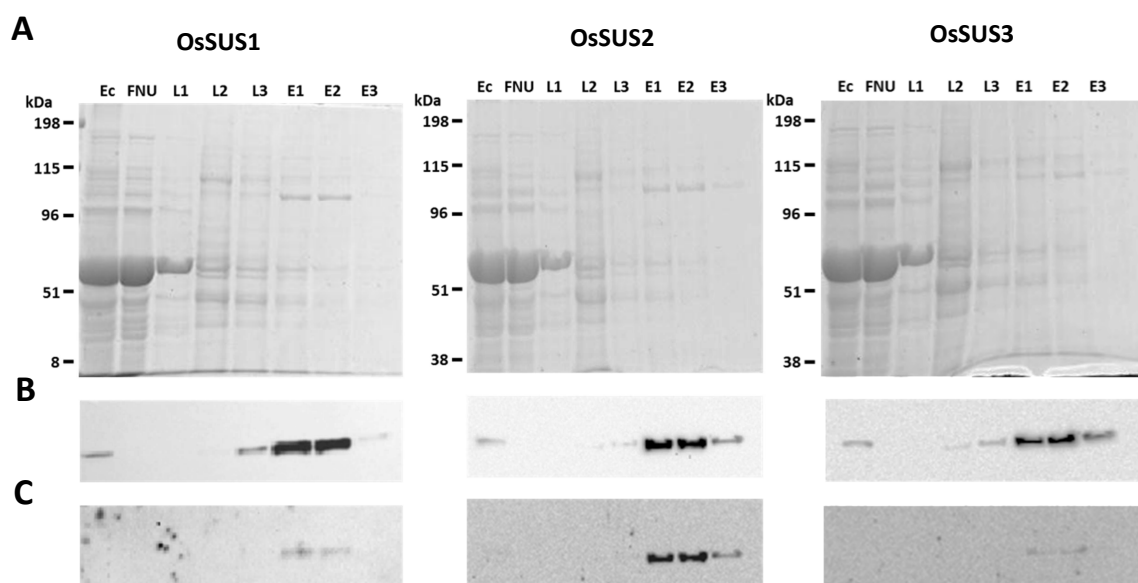


Figura III.3.9. Purificación de OsSUS1, OsSUS2 y OsSUS3

Extractos crudos obtenidos en condiciones reductoras a partir de 2,5 g de hojas de *N. benthamiana* infiltradas con cultivos de *Agrobacterium* transformados con las construcciones pGWB9-OsSUS1, pGWB9-OsSUS2 y pGWB9-OsSUS3 se utilizaron para la purificación de las tres isoformas SUS mediante cromatografía de afinidad por níquel. Alícuotas de las fracciones obtenidas en la purificación (50 μ L de Ec y FNU y 100 μ L de cada lavado y elución) se analizaron en geles de acrilamida al 8% en condiciones reductoras. El resultado de las purificaciones se observó mediante tinción de los geles con Azul de Coomassie (A) y mediante Western blot con anticuerpos anti-poliHis (B) y anti-SUS (C). Ec, extracto crudo; FNU, fracción no unida; L1, L2 y L3, lavados; E1, E2 y E3, eluciones.

III.3.7. Caracterización bioquímica de OsSUS1, OsSUS2 y OsSUS3

Una vez obtenidas preparaciones parcialmente purificadas de las tres isoformas SUS de arroz, se procedió a la determinación de sus parámetros cinéticos. Para ensayar la actividad SUS es necesario retirar inmediatamente el imidazol presente en el tampón ya que puede provocar la inactivación irreversible de la enzima (Morell and Copeland, 1985). Por lo tanto, tras cada proceso de purificación las proteínas se dializaron en tampón HEPES/KOH 50 mM suplementado con EDTA 2 mM, que favorece la estabilidad de la enzima (Avigad and Milner, 1966). Se optó además por el uso de un tampón sin agentes reductores puesto que uno de los objetivos es comprobar la modulación redox de la actividad de la enzima.

Dado que la reacción catalizada por la sacarosa sintasa es reversible,



se realizaron ensayos de actividad SUS tanto en sentido de degradación como de síntesis de sacarosa. La determinación de la actividad SUS en ambos sentidos de reacción se realizó por HPLC mediante la cuantificación de UDP o UDPG presentes en la mezcla de reacción utilizando una columna Partisil 10 SAX (Whatman) de intercambio aniónico (ver Materiales y métodos).

Este método permite la determinación de la actividad SUS en ambas direcciones mediante la cuantificación tanto de la desaparición de sustrato (UDP o UDPG) como de la aparición de producto (UDP o UDPG) respecto a los valores obtenidos para dicha reacción a tiempo cero (Figura III.3.10).

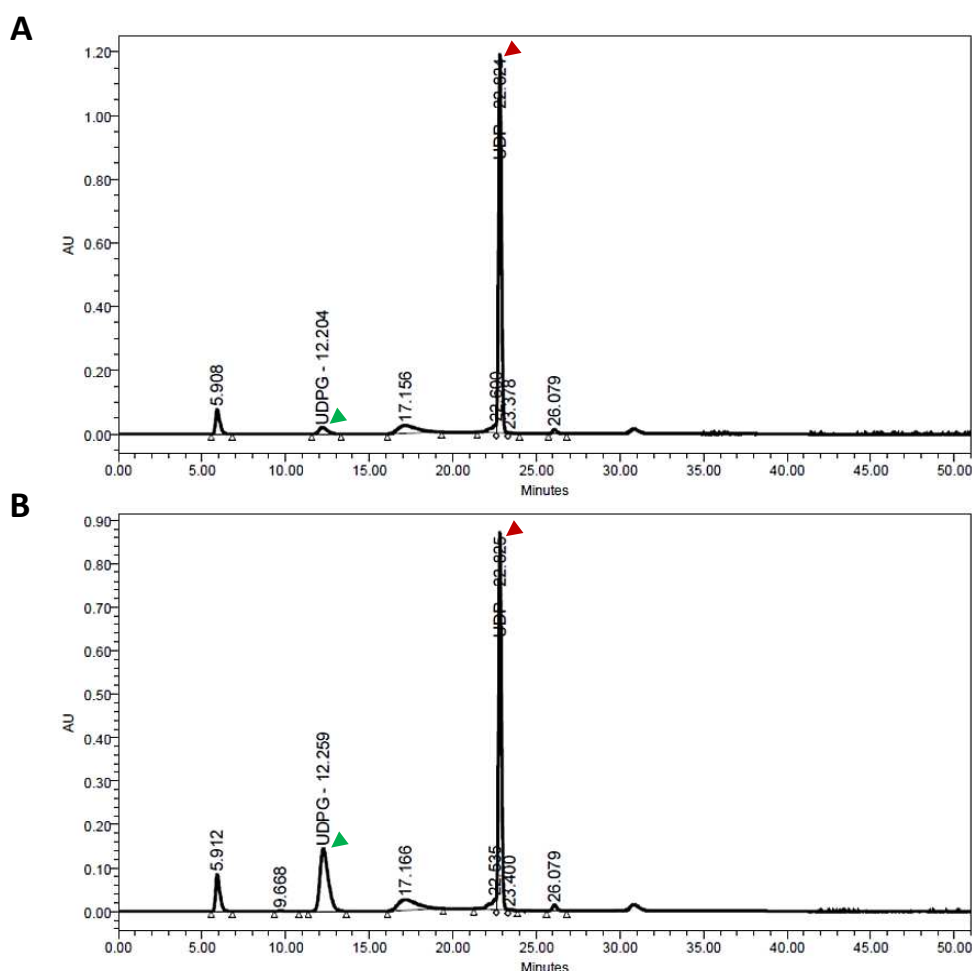


Figura III.3.10. Cromatogramas de separación y cuantificación de UDP y UDPG obtenido en HPLC

Perfiles cromatográficos obtenidos en HPLC para la determinación de la cantidad de UDP y UDPG presentes en una mezcla de reacción de un ensayo de la actividad sacarosa sintasa en el sentido de degradación de sacarosa a tiempo cero (A) y transcurridos 3 minutos de reacción (B). La mezcla de reacción contenía tampón HEPES/KOH 50 mM (pH 7,0), EDTA 2 mM, UDP 2 mM, sacarosa 200 mM y 1 μ M de la enzima purificada. Los picos correspondientes a UDP y UDPG se señalan en rojo y verde, respectivamente.

En este trabajo se utilizó la cuantificación de UDP y UDPG generados en las reacciones de síntesis y rotura de sacarosa, respectivamente, para la determinación de las actividades SUS de las diferentes isoformas purificadas. De este modo, se realizaron ensayos de actividad SUS con las tres isoformas purificadas, comprobándose que son activas en ambos sentidos de reacción.

Mediante la cuantificación de la UDPG generada en la reacción de rotura de sacarosa se pudo comprobar además que las tres isoformas purificadas presentan diferente actividad SUS, siendo OsSUS1 la de mayor actividad y OsSUS3 la de menor actividad (Figura III.3.11).

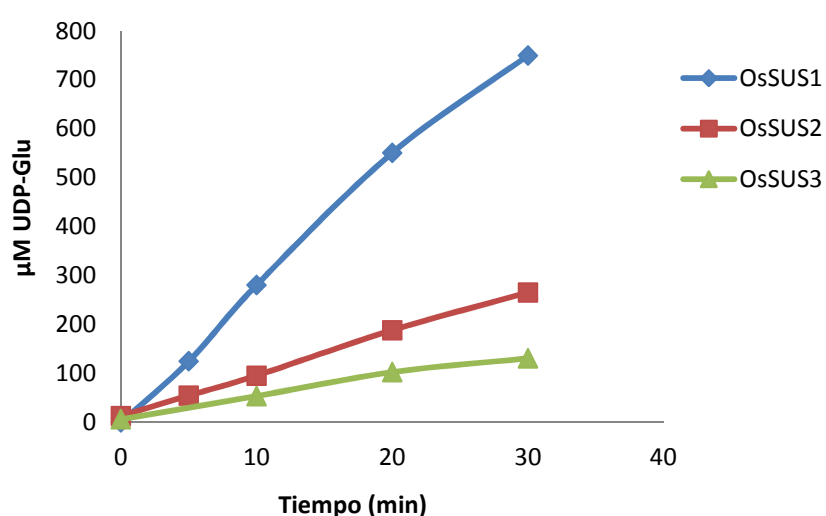


Figura III.3.11. Actividad sacarosa sintasa (rotura) de OsSUS1, OsSUS2 y OsSUS3

Se llevó a cabo un ensayo de la actividad sacarosa sintasa en el sentido de degradación de sacarosa (rotura) de las tres isoformas SUS de arroz purificadas mediante la determinación de la cantidad de UDP-Glucosa generada con el tiempo en una mezcla de reacción que contenía tampón HEPES/KOH 50 mM (pH 7,0), EDTA 2 mM, UDP 2 mM, sacarosa 200 mM y 1 μM de enzima.

Como se había descrito que el pH tiene una gran influencia sobre la actividad SUS (Pressey, 1969), se procedió a determinar el pH óptimo de las reacciones de rotura y de síntesis para cada isoforma. Se analizó un rango de pH de 6,5 a 8,0, todos en tampón HEPES/KOH 50 mM excepto el pH 6,5 realizado en tampón MES 50 mM. Las tres isoformas mostraron un perfil similar de dependencia del pH con actividad máxima a pH 6,5-7,0 en sentido de degradación y a pH 8,0 en sentido de síntesis (Figura III.3.12). De acuerdo con los resultados obtenidos, las sucesivas reacciones se realizaron a pH 7,0 en sentido de degradación (excepto para la isoforma OsSUS1 que mostró la máxima actividad a pH 6,5) y a pH 8,0 en sentido de síntesis.

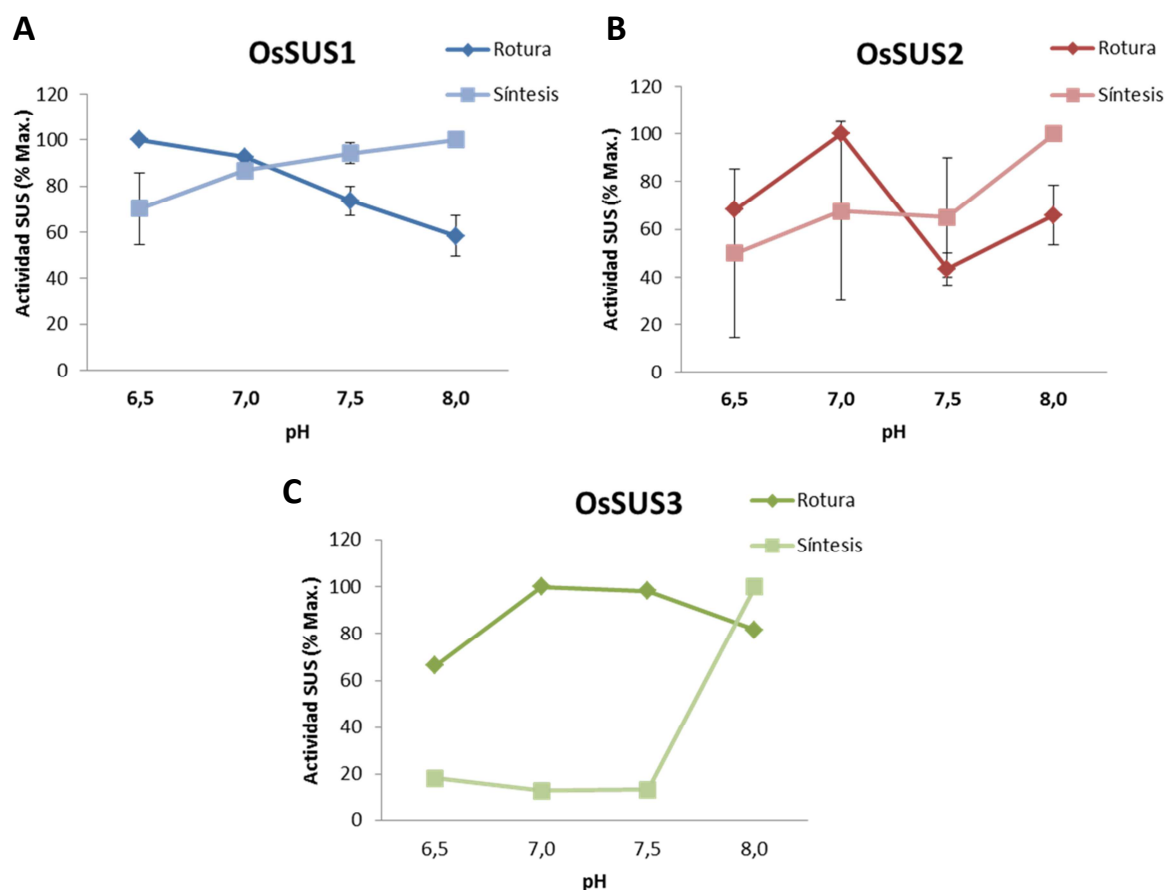


Figura III.3.12. Efecto del pH sobre la actividad sacarosa sintasa de las isoformas OsSUS1, OsSUS2 y OsSUS3

Se llevaron a cabo ensayos de actividad utilizando 1 μ M de OsSUS1 (A), OsSUS2 (B) y OsSUS3 (C) a diferentes pH durante 3 min a 37°C en una mezcla de ensayo que contenía EDTA 2 mM, UDP 2 mM y sacarosa 200 mM en sentido de degradación de sacarosa (**Rotura**); y EDTA 2 mM, UDPG 2 mM y fructosa 10 mM en sentido de síntesis de sacarosa (**Síntesis**). Los tampones usados fueron MES/KOH 50 mM (pH 6,5) y HEPES/KOH 50 mM (pH 7,0-8,0). Los resultados se expresan en porcentaje de actividad respecto a valor máximo de actividad obtenido para la reacción en cada uno de los sentidos.

Tras establecer el pH óptimo de cada reacción, se procedió a determinar los parámetros cinéticos de las tres isoformas. Para ello se llevó a cabo un estudio del efecto de la variación de la concentración de un sustrato manteniendo fija la concentración del co-sustrato sobre la actividad SUS. Dicho ensayo se realizó para cada sustrato en ambos sentidos de la reacción para cada una de las isoformas. El cálculo de las K_M para cada sustrato se realizó a través de la representación de dobles inversos. A pesar de que la actividad máxima de cada isoforma variaba de una preparación a otra, la afinidad por el sustrato se mantuvo invariable (en la Figura III.3.13 se muestran ejemplos de la actividad de las diferentes isoformas según la variación de la concentración de uno de los sustratos de la reacción). Por ello, las K_M para cada sustrato se calcularon como el promedio de las obtenidas a partir de la representación de dobles inversos de tres ensayos independientes. Sin embargo, el hecho de que la actividad de cada isoforma variase de una preparación a otra imposibilitó el cálculo de la velocidad máxima (V_{max}) por este método.

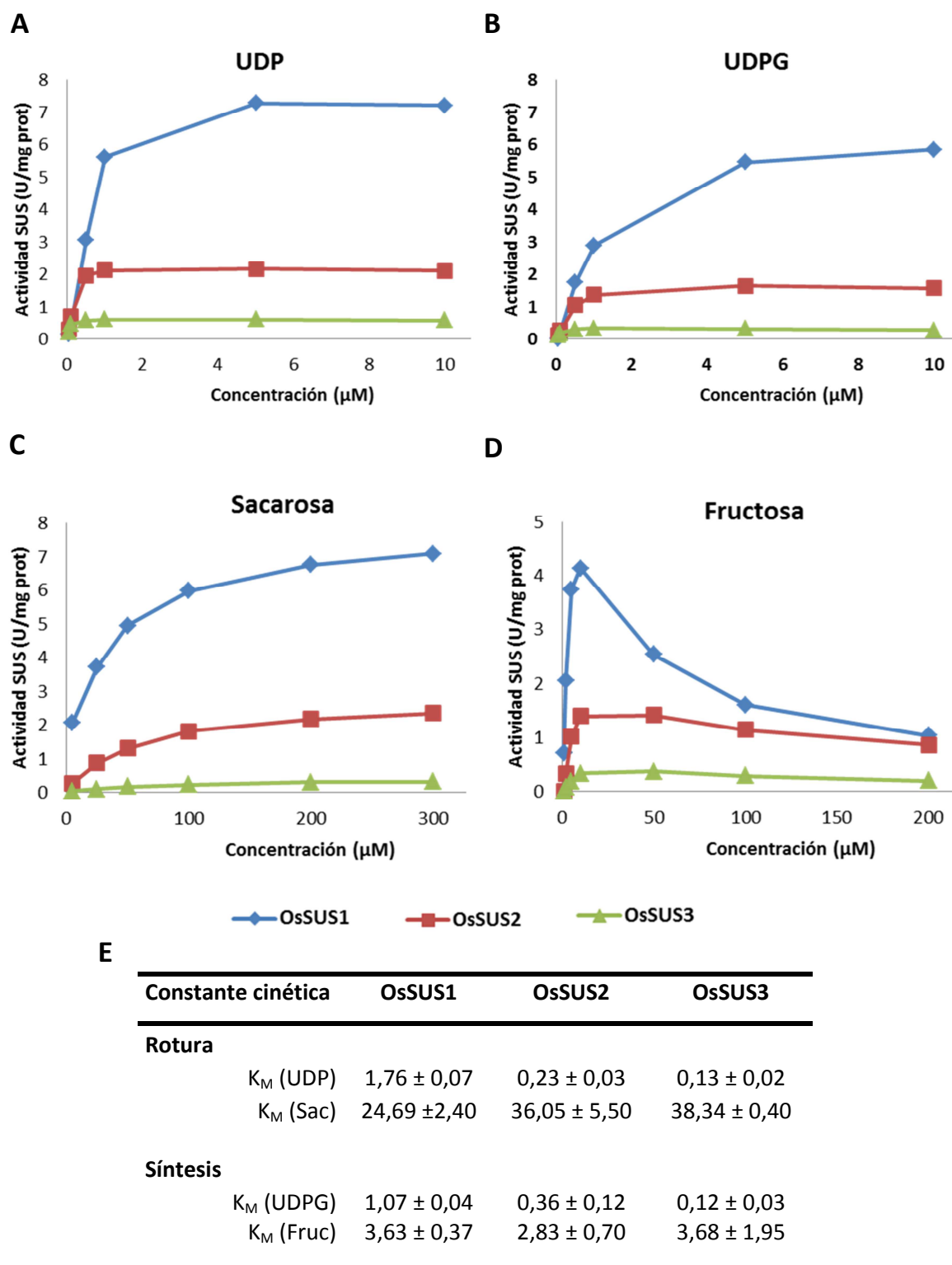


Figura III.3.13. Constantes cinéticas de las isoformas OsSUS1, OsSUS2 y OsSUS3

Se llevaron a cabo ensayos de actividad con 1 μM de OsSUS1 (Azul), OsSUS2 (Rojo) o OsSUS3 (Verde) en ambos sentidos de la reacción según se describe en *Materiales y Métodos*. En cada caso se varió la concentración de uno de los sustratos dentro de los siguientes rangos: UDP 0,05-10 mM (A); UDPG 0,05-10 mM (B); sacarosa 5-300 mM (C); fructosa 1-200 mM (D). A partir de los resultados de actividad obtenidos se determinaron las constantes cinéticas (E) mediante representación de dobles inversos.

Los resultados obtenidos muestran que las diferentes isoformas presentaron distintas afinidades por los sustratos UDP y UDPG siendo OsSUS3 la isoforma de mayor afinidad tanto para UDP como para UDPG y la isoforma OsSUS1 la que presentó menor afinidad para ambos sustratos. Las isoformas OsSUS2 y OsSUS3 presentaron afinidad similar por sacarosa mientras la isoforma OsSUS1 presentó mayor afinidad por este sustrato. En el caso de la fructosa, las tres isoformas mostraron afinidades parecidas y un patrón similar de inhibición de la actividad SUS por sustrato (Figura III.3.14), alcanzando una actividad máxima con una concentración de 25-50 mM de fructosa. Los patrones de inhibición por fructosa obtenidos son además similares a los obtenidos por otros autores para las isoformas SUS1, SUS2, SUS4 y SUS6 de *Arabidopsis* (Bieniawska et al 2007) o SUS1, SUS2 y SUS3 del guisante (Barrat et al 2001).

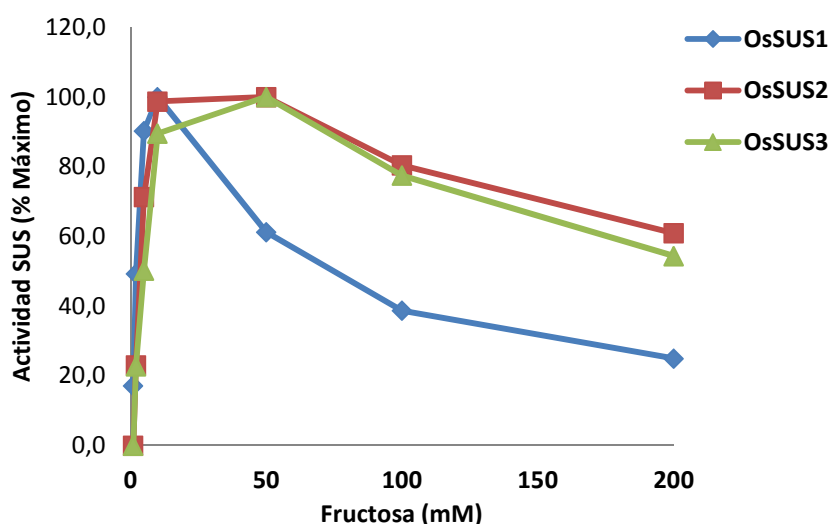


Figura III.3.14. Inhibición por sustrato (fructosa) de la actividad de las isoformas OsSUS1, OsSUS2 y OsSUS3

Se llevaron a cabo ensayos de actividad con 1 μ M de OsSUS1 (Azul), OsSUS2 (Rojo) y OsSUS3 (Verde) en sentido de síntesis de sacarosa en una mezcla de reacción que contenía HEPES/KOH 50 mM (pH 8,0), EDTA 2 mM, UDPG 2 mM y una concentración de fructosa que variaba entre 1 y 200 mM. El resultado se muestra en porcentaje de actividad respecto al máximo valor de actividad obtenido en cada caso.

Aunque se considera generalmente al UDP como el principal nucleósido difosfato utilizado por la SUS, numerosos estudios muestran que la enzima puede utilizar eficientemente ADP como sustrato para la generación de ADPG (Delmer, 1972; Silviu and Snyder, 1979; Pozueta-Romero et al., 1991). En este trabajo se estudió también la capacidad de las diferentes isoformas de utilizar UDP frente a ADP en sentido de degradación de sacarosa y de UDPG frente a ADPG en sentido de síntesis de sacarosa. Para ello se realizaron ensayos de actividad SUS utilizando UDP o ADP y UDPG o ADPG como sustrato en sentido de degradación y síntesis, respectivamente (Figura III.3.15). Las tres isoformas presentaron una notable preferencia por el uso de UDP y UDPG en ambas direcciones.

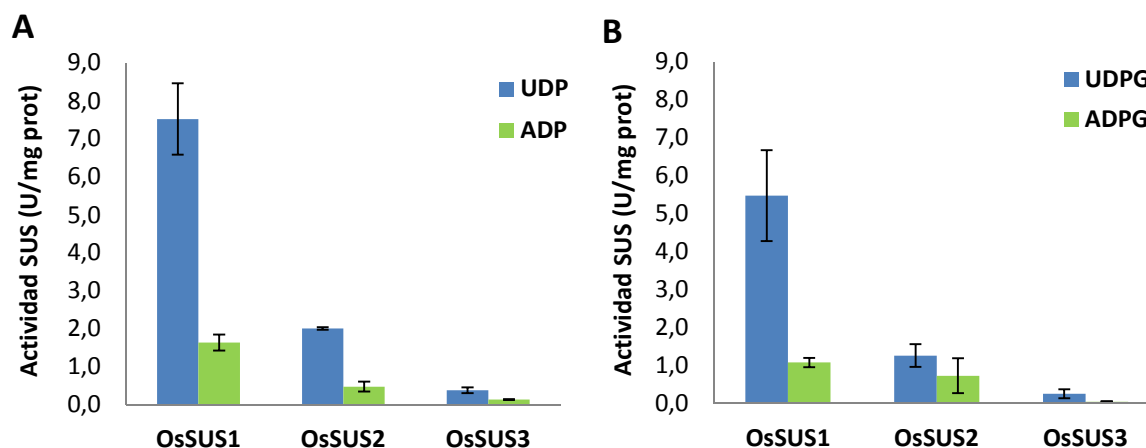


Figura III.3.15. Utilización de ADP, UDP, ADPG y UDPG como sustrato por las isoformas OsSUS1, OsSUS2 y OsSUS3
Se compararon las actividades de las isoformas OsSUS1, OsSUS2 y OsSUS3 utilizando UDP o ADP como sustrato en la reacción de degradación de sacarosa (A) y UDPG o ADPG en la reacción de síntesis de sacarosa (B). Para ello se llevaron a cabo ensayos de actividad con 1 μ M de enzima en una mezcla de ensayo que contenía MES/KOH 50 mM pH 6,5 (para OsSUS1) o HEPES/KOH 50 mM pH 7,0 (para OsSUS2 y OsSUS3), EDTA 2 mM, sacarosa 200 mM y UDP o ADP 2 mM para la reacción en sentido de degradación de sacarosa; y HEPES/KOH 50 mM pH 8,0, EDTA 2 mM, fructosa 10 mM y UDPG o ADPG 2 mM para la reacción en sentido de síntesis de sacarosa.

III.3.6.1. Estudio de la regulación redox de la actividad SUS

Estudios anteriores habían puesto de manifiesto que la actividad SUS puede ser regulada por agentes redox y que dicha modificación de la actividad implica la formación de puentes disulfuros (Pontis et al., 1981; Rohrig et al., 2004; Marino et al., 2008). Los estudios realizados por Röhrig y colaboradores (2004) en soja, identificaron el residuo de cisteína C264 como uno de las 9 cisteínas presentes en la SUS implicado en el control redox de su actividad. La cisteína 264 está conservada en la secuencia de la enzima de muchas especies vegetales como alfalfa, judía, uva, melón, naranja, guisante, patata y tomate, mientras que no está presente en las de cebada, zanahoria y tabaco (Rohrig et al., 2004). En estas especies y otros cereales como son el arroz, trigo, maíz o el sorgo, la ausencia de este residuo C264 (Figura III.3.16) indica la existencia de mecanismos alternativos de regulación de la actividad SUS.

Figura III.3.16. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de SUS de plantas

El alineamiento de las secuencias de aminoácidos se realizó mediante CLUSTALW utilizando el programa BioEdit. Las secuencias de SUS de Soja, *Arabidopsis*, Patata, Maíz, Arroz y Cebada se obtuvieron de la base de datos GenBank con los números de acceso NP_001237525.1, NP_197583.1, CAD61188.1, AAA68209.1, AAK52129.1 y CAA75793.1 respectivamente. En rojo se señalan las cisteínas conservadas, en verde las semi-conservadas, en amarillo las conservadas en cereales y en azul las conservadas solo en especies no cereales.

El alineamiento de las secuencias de aminoácidos se realizó mediante CLUSTALW utilizando el programa BioEdit. Las secuencias de SUS de Soja, *Arabidopsis*, Patata, Maíz, Arroz y Cebada se obtuvieron de la base de datos GenBank con los números de acceso NP_001237525.1, NP_197583.1, CAD61188.1, AAA68209.1, AAK52129.1 y CAA75793.1 respectivamente. En rojo se señalan las cisteínas conservadas, en verde las semi-conservadas, en amarillo las conservadas en cereales y en azul las conservadas solo en especies no cereales.

Como en este trabajo se había identificado la SUS como proteína diana de NTRC en endospermo, se estudió la posibilidad de que las tres isoformas de SUS aquí analizadas estuvieran sometidas a regulación redox mediada por NTRC. Para ello se sometieron a las OsSUS purificadas a tratamientos con agentes oxidantes y reductores y se compararon sus actividades. La necesidad de utilizar agentes reductores en el proceso de purificación conllevaba la obtención de las proteínas en estado reducido, por ello se requería un tratamiento de oxidación de la proteína para comparar las actividades en ambos estados redox. Los ensayos de actividad se realizaron en sentido de degradación de sacarosa con las diferentes isoformas purificadas sin tratar y tras un tratamiento de oxidación con peróxido de hidrógeno (Figura III.3.17).

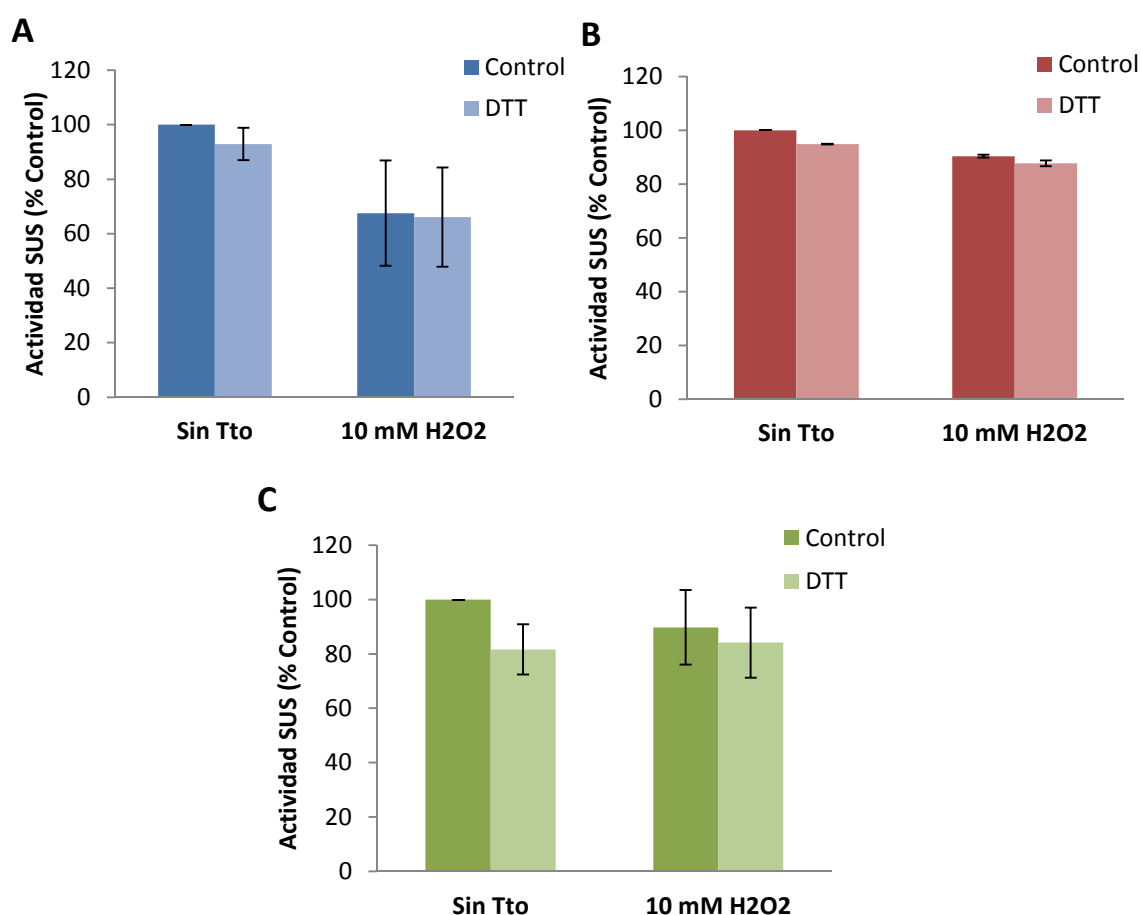


Figura III.3.17. Efecto de agentes reductores u oxidantes sobre la actividad de las isoformas OsSUS1, OsSUS2 y OsSUS3

Se compararon las actividades de las isoformas OsSUS1 (A), OsSUS2 (B) y OsSUS3 (C) sin tratar (**Sin Tto**), tras un tratamiento con H₂O₂ 10 mM durante 30 min (**H2O2**) en condiciones control o tras un tratamiento con DTT 10 mM durante 10 min. La actividad se determinó en sentido de degradación en una mezcla de reacción que contenía MES/KOH 50 mM pH 6,5 (para OsSUS1) o HEPES/KOH 50 mM pH 7,0 (para OsSUS2 y OsSUS3), EDTA 2 mM, sacarosa 200 mM, UDP 2 mM y 1 μ M de enzima. Los resultados se muestran como porcentaje de actividad respecto al valor obtenido para cada isoforma sin tratar en condiciones control.

Las actividades obtenidas bajo estas condiciones de ensayo, a las que denominamos 'Control', se compararon con las actividades de dichas isoformas tras un tratamiento reductor con DTT. El tratamiento con peróxido de hidrógeno provocó una disminución notable de la actividad de la isoforma OsSUS1 y, en menor medida, de OsSUS2 y OsSUS3. El tratamiento con DTT no alteró la actividad de las proteínas en ninguna de las dos condiciones ensayadas (sin tratamiento y tratadas con el agente oxidante) e incluso provocó una disminución leve de la actividad de la enzima sin tratar en las tres isoformas.

III.3.8. Actividad sacarosa sintasa en endospermo de arroz. Regulación redox

Comparado con el amplio conocimiento que existe sobre la regulación de la SUS a nivel transcripcional en respuesta a cambios ambientales, se conoce poco sobre la modulación de la actividad SUS en respuesta a estos cambios ambientales (Marino et al., 2008). Pontis y colaboradores en 1981 demostraron que la actividad SUS se modifica por la acción de agentes oxidorreductores y que, aunque aún no se ha descrito el mecanismo de regulación, podría estar basada en la oxidación/reducción reversible de grupos tioles (Pontis et al., 1981). En nódulos de leguminosas se demostró que el residuo de cisteína C264 de la SUS estaba implicado en el establecimiento de un puente disulfuro reversible con un péptido (MELCWLTTHGS) derivado de un mRNA ENOD40 y que dicha interacción provocaba un incremento de su actividad enzimática en el sentido de degradación de la sacarosa (Rohrig et al., 2004). Posteriormente se demostró, también en nódulos de leguminosas, que la actividad SUS se inhibe ante la presencia de agentes oxidantes confirmando con ello la existencia de un control redox de su actividad (Marino et al., 2008).

En este trabajo se ha identificado a la SUS como posible proteína diana de NTRC en endospermo de cereales, lo que sugiere que en este tejido la actividad SUS también podría estar sometida a regulación redox. Con el objetivo de estudiar la posibilidad de que la actividad SUS esté modulada por el estado redox, se realizaron ensayos del efecto de agentes oxidantes o reductores sobre la actividad SUS en extractos de endospermo de semillas de arroz en desarrollo (Figura III.3.18). En extractos de endospermo no se apreciaron cambios en la actividad SUS en respuesta a estos agentes oxidantes y/o reductores. Por el contrario, la actividad SUS de hoja se mostró sensible a la aplicación de un agente oxidante que provocó una severa disminución de la misma. Además, el tratamiento posterior con un agente reductor (DTT) no tuvo ningún efecto activador. El tratamiento de ambas muestras oxidadas con NTRC provocó en cambio una reducción de la actividad SUS, siendo especialmente drástica en el caso de la hoja. La actividad SUS de extractos sin tratar no se vio alterada en ninguno de los

dos casos por el tratamiento reductor con DTT, indicando que la proteína estaría en la célula en un estado completamente reducido.

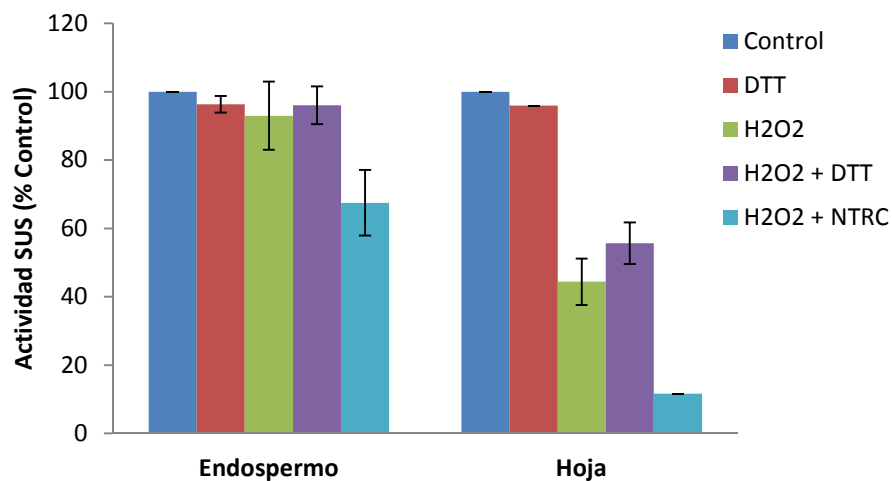


Figura III.3.18. Efecto de agentes oxidantes y reductores sobre la actividad SUS de endospermo y hoja de arroz

Se realizaron ensayos de actividad SUS en sentido de degradación de la sacarosa a partir de extractos proteicos (50 μ L) de endospermo de semillas en desarrollo y hoja de arroz sometidos a diferentes tratamientos: **Control**, sin tratamiento previo; **DTT**, DTT 10 mM durante 10 min; **H2O2**, H2O2 10 mM durante 10 min; **H2O2 + DTT**, H2O2 10 mM durante 10 min seguido de DTT 10 mM durante 10 min; **H2O2 + NTRC**, H2O2 10 mM durante 10 min seguido de 10 μ M NTRC y NADPH 250 μ M durante 10 min. Para la reacción SUS se utilizó una mezcla de ensayo que contenía HEPES/KOH 50 mM (pH 7,0), EDTA 2 mM, UDP 2 mM y sacarosa 200 mM. Los resultados se muestran como porcentaje de actividad respecto al control en cada caso.

IV. DISCUSIÓN

La regulación redox, una modificación post-traducciona consistente en el intercambio disulfuro-ditiol de residuos de cisteína, es un mecanismo rápido y reversible que permite la adaptación del metabolismo a las condiciones ambientales y necesidades celulares. En este tipo de regulación las Trxs, proteínas de pequeño tamaño con dos cisteínas muy conservadas en su sitio activo, juegan un papel central ya que catalizan la reducción de puentes disulfuro de sus proteínas diana participando así en la regulación de su actividad. Como consecuencia de la catálisis, las dos cisteínas de las Trxs quedan oxidadas formando un puente disulfuro que ha de ser reducido para que se produzca un nuevo ciclo catalítico. Por tanto, la regulación redox requiere poder reductor, que es proporcionado en todos los organismos, desde bacterias a plantas y animales, por NADPH en una reacción catalizada por la enzima NTR. Las NTRs son flavoproteínas cuya familia génica está compuesta en plantas por tres genes: *NtrA*, *NtrB* y *NtrC* (Serrato et al., 2004). Los dos primeros codifican proteínas muy similares, NTRA y NTRB, de localización citosólica y mitocondrial, ambas muy abundantes en semillas de cereales (Jacquot et al., 1994; Laloi et al., 2001; Shahpiri et al., 2008). El tercer gen codifica NTRC, una NTR peculiar que posee un dominio Trx en el extremo C-terminal (Serrato et al., 2004; Moon et al., 2006). Inicialmente NTRC se describió como una enzima exclusiva de tejidos fotosintéticos y localización cloroplastídica; sin embargo, estudios recientes sobre el patrón de expresión del gen *NtrC* en *Arabidopsis* revelaron que se expresa tanto en tejidos fotosintéticos como no fotosintéticos y que la proteína se localiza en todo tipo de plastos (Kirchsteiger et al., 2012). En el cloroplasto NTRC participa en la destoxificación de peróxidos actuando como principal reductor fisiológico de 2-Cys Prxs (Moon et al., 2006; Perez-Ruiz et al., 2006; Alkhalfioui et al., 2007), sin embargo, cada vez son más las evidencias que demuestran que NTRC participa en la regulación redox de otros procesos como son la síntesis de almidón (Michalska et al., 2009), la síntesis de aminoácidos aromáticos (Lepisto et al., 2009) o la síntesis de clorofilas (Stenbaek and Jensen, 2010).

El objetivo principal de este trabajo ha sido la identificación de procesos sometidos a regulación redox mediada por NTRC en tejidos heterotróficos de plantas de interés agronómico. Para ello nos hemos centrado en el estudio del patrón de expresión y la identificación de las funciones que lleva a cabo NTRC en el endospermo de semillas de cereales.

IV.1. El gen *NtrC* se expresa en endospermo de semillas de cereales dando lugar a una enzima con características peculiares

NTRC está codificada por un gen de copia única que se encuentra exclusivamente en organismos fotosintéticos: plantas, algas y algunas cianobacterias (Pascual et al., 2010). En todos ellos, tanto la secuencia aminoacídica como la estructura bimodular de la proteína se encuentran altamente conservadas (Figura III.1.1). La estrecha relación filogenética encontrada entre las NTRC de plantas, y en particular de cereales, (Figura III.1.2) sugiere un comportamiento y regulación de la enzima similar en las diferentes especies.

El primer objetivo que nos hemos planteado en este trabajo ha sido determinar el patrón de expresión del gen *NtrC* en semillas de cereales, en concreto arroz y trigo. Los experimentos de qPCR realizados con semillas en desarrollo de arroz y de trigo demostraron la expresión de *NtrC* en semillas de cereales, aunque, los niveles de transcrito durante todo el desarrollo de las semillas en ambos casos era notablemente inferior a los detectados en hoja (Figuras III.1.4.A y III.1.8.A, respectivamente). Estos datos de expresión concuerdan con los obtenidos en órganos heterotróficos en *Arabidopsis*, donde la expresión de *NtrC* es siempre inferior a la de órganos fotosintéticos (Kirchsteiger et al., 2012). Los análisis inmunológicos realizados revelaron la presencia de la proteína en semillas en desarrollo de arroz y de trigo (Figuras III.1.4.B y III.1.8.B, respectivamente), confirmando con ello la presencia de NTRC en un órgano heterotrófico diferente a los identificados hasta el momento (Kirchsteiger et al., 2012), las semillas de cereales.

Estudios previos realizados tanto en arroz como en *Arabidopsis* han establecido que la NTRC del cloroplasto es una enzima bimodular compuesta por dos dominios, NTR y Trx (Serrato et al., 2004). De acuerdo con las secuencias de cDNA de NTRC de diferentes plantas, la proteína madura posee un peso molecular de 50-53 kDa. En concreto, en el caso del arroz la proteína identificada en tejidos fotosintéticos tiene un peso molecular de 51,5 kDa (Serrato et al., 2004), que ha sido confirmado por los análisis *Western blot* realizados en este trabajo (Figura III.1.4.B). Sin embargo, los análisis realizados con endospermo de semillas de arroz con el anticuerpo anti-NTRC identificaron una proteína con un tamaño de unos 90 kDa y la ausencia de la banda esperada, de 51,5 kDa, correspondiente a la enzima detectada en tejidos fotosintéticos. En este trabajo hemos llevado a cabo diversas aproximaciones para confirmar si esta proteína de mayor peso molecular era efectivamente una forma peculiar de NTRC. Estudios inmunológicos mostraron que esta proteína mantiene la estructura bimodular presentando un módulo NTR, reconocido por el anticuerpo anti-NTRB (Figura III.1.9), y un

módulo Trx, reconocido por el anticuerpo anti-NTRC que detecta específicamente este módulo de la proteína (Figura III.1.4.B). Los análisis realizados en presencia de agentes desnaturalizantes, como la urea, y condiciones reductoras permitieron descartar que esta banda se debiera a la formación de un complejo con otra proteína (Figura III.1.10). Además, análisis proteómicos de esta proteína mediante MALDI-TOF confirmaron que se trataba realmente de NTRC (Figura III.1.12). En conjunto estos resultados indican la existencia de una forma peculiar de NTRC exclusiva del endospermo de semillas de arroz, ausente en tejidos fotosintéticos donde los análisis inmunológicos sólo detectaron a NTRC con el tamaño convencional de 51,5 kDa. Esta forma peculiar de NTRC se detectó tanto en el desarrollo como en la germinación de las semillas (Figuras III.1.4.B y III.1.11). De hecho, si las muestras de endospermo de semillas conservan el pericarpo, que en las fases iniciales e intermedias del desarrollo es un tejido fotosintético, los análisis *Western blot* permitieron identificar ambas formas de NTRC, siendo la forma de 90 kDa la predominante (Figuras III.1.9 y III.1.10). Similares resultados se obtuvieron en semillas de trigo en las que se detectó una forma de NTRC en endospermo de mayor tamaño que la de hoja, si bien, en este cereal no se pudo definir con exactitud el tamaño de esta proteína por la aparición de más de una banda en los análisis *Western blot*. Habiéndose identificado formas peculiares de NTRC de mayor tamaño en dos especies diferentes de cereales podría considerarse, por tanto, como una NTRC característica del endospermo de semillas de cereales.

Los estudios realizados en este trabajo sobre la nueva forma de NTRC de endospermo aportaron información relacionada con la estructura bimodular de la proteína, sin embargo no permitieron la identificación de la composición peptídica de la extensión de la proteína que da lugar a una forma de NTRC con un tamaño de unos 40 kDa mayor que la descrita hasta el momento. Dado que el genoma del arroz está completamente secuenciado y a pesar de que se ha descrito que el gen que codifica NTRC en arroz es de copia única (Serrato et al., 2004), se realizó una búsqueda exhaustiva, mediante comparación de secuencias, de un gen que codificase esta nueva forma de NTRC de mayor tamaño. Sin embargo de esta búsqueda no se obtuvieron resultados. Descartada la presencia de otro gen que codifique esta forma peculiar de NTRC, se analizó la posibilidad de que esta proteína se generara por un mecanismo de procesamiento alternativo del mensajero en este tejido, que daría lugar a un transcrito de mayor tamaño. A favor de esta idea los análisis *Northern blot* identificaron una banda de mayor tamaño en endospermo, que estaba ausente en hoja (Figura III.1.14). Las distintas estrategias para identificar este mensajero específico de endospermo mostraron que el mensajero que se expresa en este tejido es idéntico al que se encuentra en hoja en sus

regiones central y 3' (Figuras III.1.13, III.1.16 y III.1.17); sin embargo, difiere en su región 5'. Estos resultados sugieren que, efectivamente, se podrían estar produciendo fenómenos de procesamiento alternativo en esta región del mensajero específicamente en endospermo, pero estas secuencias no han podido ser identificadas con las distintas aproximaciones llevadas a cabo en este trabajo.

Otra peculiaridad que muestra NTRC en endospermo de semillas de cereales es su localización subcelular. Inicialmente NTRC se describió como una proteína cloroplástica exclusiva de tejidos fotosintéticos (Serrato et al., 2004). Resultados más recientes muestran que la proteína se encuentra también en tejidos no fotosintéticos pero con localización siempre plastidial en *Arabidopsis* (Kirchsteiger et al., 2012). Siendo el endospermo de semillas de cereales un tejido heterotrófico que posee un número elevado de amiloplastos donde acumula el almidón y que ocupa la mayor parte del volumen celular, era de esperar que NTRC estuviese localizada en dichos plastos. Sorprendentemente, los ensayos de inmunolocalización realizados en semillas de trigo en desarrollo mostraron una posible localización citosólica de NTRC en el endospermo y la capa de aleurona (Figura III.1.18), aunque hay que tener en cuenta que esta técnica tiene un nivel de resolución limitado para establecer sin duda esta localización. La presencia de NTRC en el citosol de las células de endospermo y aleurona de la semilla de los cereales podría ser el resultado del posible procesamiento diferencial del gen en endospermo que altera la secuencia amino terminal de la proteína donde se localiza el péptido de tránsito al plasto. Los resultados obtenidos en este trabajo, que indican una posible localización citosólica, no permiten descartar la localización plastidial de NTRC en este tejido.

El patrón de localización de NTRC en semillas de trigo, con posible localización citosólica y/o plastidial es muy similar al obtenido para la AGPasa (Figura III.1.19), una de sus proteínas diana en tejido heterotróficos de *Arabidopsis* (Michalska et al., 2009). La AGPasa es una proteína de localización plastidial en tejidos fotosintéticos, que en endospermo de semillas de cereales presenta una forma citosólica mayoritaria durante el desarrollo de la semilla (Denyer et al., 1996; Beckles et al., 2001). La similitud en el patrón de localización de ambas proteínas, NTRC y AGPasa, apoya la hipótesis de que NTRC podría tener una localización citosólica en endospermo de semillas de cereales y refuerza además la posibilidad de que NTRC esté participando en la regulación redox de procesos implicados en la síntesis de almidón en endospermo de semillas de cereales, confirmada por las dianas identificadas de NTRC en este tejido, como se discutirá más adelante. Tanto los análisis de *Western blot* como los estudios inmunocitoquímicos muestran que NTRC es una proteína relativamente abundante en células de aleurona, lo que podría estar indicando además una posible participación de la

enzima en la tolerancia que desarrolla este tejido al estrés oxidativo generado durante la desecación de la semilla en la fase final del desarrollo. Cabe resaltar en este sentido que mientras existe evidencia de que el sistema NTR/Trx *h* se acumula en el núcleo de estas células e interacciona con la 1-Cys Prx (Serrato et al., 2002; Serrato and Cejudo, 2003; Pulido et al., 2009), lo que indica una posible función antioxidante, entre las dianas identificadas para NTRC en endospermo no se encuentran peroxidadas (Tablas III.2.3 y III.2.6). Estos resultados sugieren que la función de NTRC en respuesta a estrés oxidativo en semillas no es relevante.

IV.2. La identificación de dianas de NTRC en endospermo de semillas de cereales sugiere diferentes funciones de la enzima

El endospermo de las semillas de los cereales es el tejido encargado de la síntesis y acumulación de compuestos de reserva capaces de aportar los requerimientos energéticos de la nueva plántula durante la germinación. El principal compuesto de reserva en el endospermo es el almidón que, acumulado en los amiloplastos, ocupa la mayor parte del volumen de las células que componen este tejido y puede llegar a suponer hasta el 70% de peso seco de la semilla (Hannah and James, 2008). Es por ello que la actividad metabólica del endospermo de semillas se relaciona principalmente con la síntesis y degradación del almidón, que tienen lugar en los amiloplastos. Sin embargo, estudios proteómicos llevados a cabo en amiloplastos aislados de endospermo de semillas de trigo revelaron que además del metabolismo del almidón, en los amiloplastos tienen lugar una enorme diversidad de rutas metabólicas relacionadas con la síntesis de aminoácidos, ácidos nucleicos y ácidos grasos, la síntesis y transporte de proteínas, la señalización celular o la regulación redox, entre otras (Balmer et al., 2006; Balmer et al., 2006; Dupont, 2008). Además del metabolismo celular y de los procesos biosintéticos llevados a cabo en los amiloplastos, en las células del endospermo tiene lugar la síntesis de proteínas de reserva, de gran importancia dada su abundancia en estas células y la incidencia que tienen sobre la calidad del grano (Sabelli and Larkins, 2009).

Diferentes estudios realizados en endospermo de semillas de cereales han identificado un elevado número de proteínas, componentes de los diversos procesos identificados en este tejido, que están sometidas a regulación redox vía intercambio tiol-disulfuro (Montrichard et al., 2009). Entre los agentes que participan en la regulación redox de dichas proteínas en el endospermo se encuentran las Trxs. En este tejido, las Trxs catalizan la reducción de sus proteínas diana tomando el poder reductor del NADPH a través del sistema NTR/Trx *h* (en el citosol, mitocondria y núcleo) (Serrato et al., 2002; Pulido et al., 2009) o a través del sistema

Fd/FTR/Trx *m* (en el amiloplasto)(Balmer et al., 2006). La regulación redox mediada por Trxs constituye un componente importante en el metabolismo de las semillas de cereales tanto en la fase de desarrollo (Wong et al., 2003; Wong et al., 2004; Balmer et al., 2006) como de germinación (Marx et al., 2003; Maeda et al., 2004; Yano and Kuroda, 2006; Hagglund et al., 2008).

La descripción en este trabajo de la presencia de una forma peculiar de NTRC en el endospermo respalda la importancia de la regulación redox en el metabolismo de semillas de cereales. Las propiedades bioquímicas de NTRC, entre las que se encuentran su alta afinidad por el NADPH y la presencia de un módulo Trx en su extremo carboxilo, hacen que esta enzima constituya un sistema NTR/Trx capaz de convertir el poder reductor del NADPH en señal redox en los grupos tiólicos de los residuos de cisteínas del sitio activo del módulo tiorredoxina. Con el objetivo de identificar las funciones que NTRC lleva a cabo en este tejido, y basándonos en los conocimientos generados en la búsqueda de proteínas diana de tiorredoxinas, en este trabajo se han llevado a cabo estudios de búsqueda de proteínas diana de NTRC en endospermo de semillas de cereales.

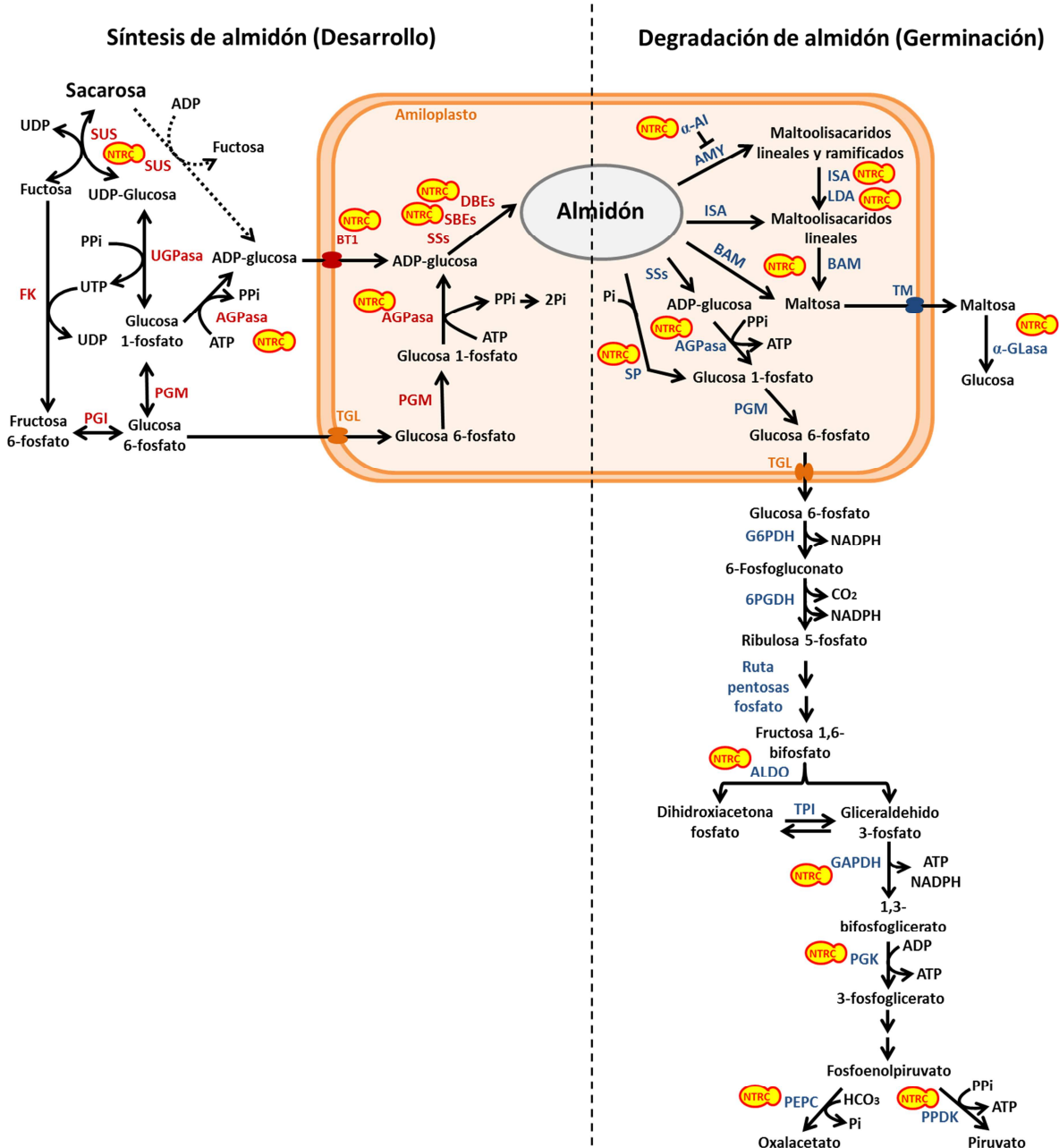
Por un lado, se han llevado a cabo experimentos de búsqueda de proteínas diana de NTRC en endospermo de semillas de arroz y de trigo mediante cromatografía de afinidad utilizando un mutante del sitio activo del módulo Trx de la enzima, ya que se había establecido previamente que NTRC interacciona con sus proteínas diana a través de este módulo (Perez-Ruiz and Cejudo, 2009; Bernal-Bayard et al., 2012). Esta metodología permite la identificación de proteínas que interaccionan con NTRC mediante el establecimiento de un puente disulfuro. Sin embargo, tiene el inconveniente de que se pueden detectar inespecíficamente proteínas que interaccionan con Trxs, al ser el módulo Trx de NTRC el implicado en el establecimiento del puente disulfuro. Así, de las 59 y 35 posibles dianas de NTRC identificadas en endospermo de semillas de arroz y de trigo, respectivamente, aproximadamente la mitad de ellas habían sido identificadas previamente como proteínas diana de Trxs. Naturalmente, existe la posibilidad de que estas proteínas estén efectivamente reguladas por NTRC y por Trxs, dependiendo de su localización celular, de condiciones ambientales o de otros factores. Pero son necesarios más ensayos para establecer la especificidad de los distintos sistemas redox en la regulación de estas proteínas. Por otro lado, se llevaron a cabo estudios de inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-NTRC sobre extractos de endospermo de semillas de arroz. Esta metodología ha permitido la identificación de proteínas cuya interacción no implica la formación de puentes disulfuro o bien que formen parte de complejos proteicos de los que una o varias proteínas sean dianas de NTRC. Esta posibilidad se apoya en diferentes estudios realizados en semillas de

cereales en desarrollo (en trigo y maíz) donde se demuestra la formación de complejos proteicos de enzimas que participan en la síntesis de almidón (Tetlow et al., 2004; Tetlow et al., 2004; Hennen-Bierwagen et al., 2008; Tetlow et al., 2008; Hennen-Bierwagen et al., 2009). Al igual que ocurría con la cromatografía de afinidad, la inmunoprecipitación de NTRC no discrimina entre posibles proteínas diana de NTRC y de Trxs, de hecho, de las 35 posibles dianas de NTRC identificadas mediante inmunoprecipitación, 24 habían sido previamente identificadas como posibles dianas de Trxs.

Los experimentos de búsqueda de proteínas diana de NTRC en endospermo de semillas de cereales se realizaron a partir de extractos proteicos totales de endospermo debido a que, tras los resultados obtenidos en este trabajo que sugieren una posible localización citosólica, se desconoce la localización exacta de NTRC en las células de este tejido. Usando extractos proteicos totales se favorece la formación de interacciones inespecíficas con NTRC al poner en contacto proteínas pertenecientes a diferentes compartimentos celulares. Por este motivo, entre las candidatas a dianas de NTRC en ambos casos, arroz y trigo, encontramos proteínas de diversa localización subcelular, incluyendo proteínas plastidiales, citosólicas, nucleares, mitocondriales, microsomales, asociadas a la membrana plasmática o de pared celular.

Mediante las dos aproximaciones se han identificado en este trabajo un total de 79 posibles proteínas diana de NTRC en endospermo de semillas de arroz. En semillas de trigo en las que solo se utilizó el método de cromatografía de afinidad, se identificaron 35 proteínas como posibles dianas de NTRC. Las proteínas aquí identificadas tienen funciones diversas y participan en diferentes procesos celulares que tienen lugar en las células del endospermo de semillas de cereales: metabolismo, que incluye el metabolismo de carbohidratos, de ácidos grasos y de aminoácidos; síntesis y transformación del ATP; síntesis y degradación de proteínas; formando parte de la estructura celular; funcionando como proteínas de almacenamiento, de defensa o de respuesta a estrés; transducción de señales; procesamiento del DNA y RNA; o en el transporte de proteínas, entre otras. Se discute a continuación cada una de estas funciones.

Metabolismo de carbohidratos. Entre las proteínas que participan en el metabolismo de carbohidratos es donde se han identificado un mayor número de posibles dianas de NTRC, en particular, aquellas que están implicadas directamente con el metabolismo del almidón. Dado que la síntesis de almidón es el principal proceso durante el desarrollo de las semillas de los cereales, no es sorprendente que una de las funciones que pudiera estar llevando a cabo NTRC en este tejido esté relacionada con dicho metabolismo. Todas las enzimas implicadas en la ruta



Estas enzimas incluyen las subunidades grande (LS) y pequeña (SS) de la AGPasa, enzimas ramificantes (1 y 3) y desramificantes (pululanasa y isoamilasa) del almidón, el transportador de ADP-glucosa *Brittle-1* (BT1). Cabe destacar también la identificación de la sacarosa sintasa (SUS), como primera enzima participante en la conversión de la sacarosa en almidón en tejidos heterotróficos, y la almidón fosforilasa, que se ha relacionada también con la síntesis de almidón en semillas de cereales en desarrollo (Schupp and Ziegler, 2004; Tickle et al., 2009). La identificación de la AGPasa como posible diana de NTRC en endospermo de semillas de cereales confirma la participación de NTRC en la regulación redox de esta enzima en tejidos heterotróficos, como se había sugerido previamente (Michalska et al., 2009). En plastos, la regulación redox de la AGPasa se ha demostrado que podría estar mediada tanto por Trxs como por NTRC, capaces de provocar la activación de la enzima mediante la reducción del puente disulfuro establecido entre residuos de cisteínas de las subunidades pequeñas (Ballicora et al., 2000; Geigenberger et al., 2005; Michalska et al., 2009). La subunidad pequeña (SS) de la AGPasa citosólica de cereales carece de la cisteína implicada en la regulación redox anteriormente descrita. La identificación de esta subunidad en endospermo de cereales como diana de NTRC puede deberse bien a que se trata de la forma plastidial o bien que la forma citosólica presente una regulación redox alternativa a la de la forma plastidial. La subunidad grande (LS) de la AGPasa, también había sido identificada previamente como diana de Trxs en cereales (Wong et al., 2004), sin embargo, no se ha descrito hasta el momento ningún mecanismo de regulación redox para esta subunidad.

Las enzimas implicadas en la síntesis de almidón, SUS, AGPasa (LS y SS) y enzimas ramificantes (SBE), junto con las enzimas gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), piruvato fosfato diquinasa (PPDK), inhibidores de α -amilasas y la enzima α -glucosidasa fueron identificadas repetitivamente en endospermo de semillas de arroz con ambas metodologías, cromatografía de afinidad e inmunoprecipitación, y en endospermo semillas de trigo mediante cromatografía de afinidad. La identificación de estas proteínas mediante dos aproximaciones diferentes y en semillas de dos especies diferentes, las convierte en firmes candidatas a dianas de NTRC en endospermo sugiriendo la participación directa de NTRC en el metabolismo del almidón. A favor de esta hipótesis está el hecho de que cuatro de estas posibles diana de NTRC en endospermo (SUS, AGPasa (LS y SS), SBE y PPDK) han sido identificadas, junto con la enzima almidón sintasa (no identificada entre las posibles dianas en este trabajo), como componentes de complejos multiproteicos en amiloplastos de endospermo de semillas de maíz en desarrollo (Hennen-Bierwagen et al., 2009). Según Hennen-Bierwagen y colaboradores, estos complejos multiproteicos controlarían el reparto del carbono dirigiéndolo hacia la síntesis de almidón

durante el desarrollo de la semilla permitiendo a su vez la producción de aminoácidos requerida para la acumulación de proteínas en la fase final del desarrollo.

La GAPDH citosólica ha sido identificada previamente como diana de Trxs en diferentes estudios con semillas de cereales (Montrichard et al., 2009), habiéndose demostrado un incremento de su actividad *in vitro* mediante reducción (Wong et al., 2003). La posible modulación redox de su actividad por Trxs en semillas de cereales, junto con la repetitiva identificación en los experimentos de identificación de dianas de NTRC en endospermo, hacen que la GAPDH sea una sólida candidata a diana de NTRC en este tejido. Los inhibidores de α -amilasas ejercen una doble función en las células vegetales, previniendo la degradación del almidón por las α -amilasas y participando a su vez en la defensa de la planta frente a patógenos. Las proteínas pertenecientes a la familia de los inhibidores de α -amilasas poseen varios residuos de cisteínas conservadas sometidos a regulación redox donde se ha demostrado que participan específicamente las Trxs (Kobrehel et al., 1991). La consistente identificación de este tipo de proteínas entre las dianas de NTRC indica su posible participación en la activación de los inhibidores de α -amilasas en endospermo de semillas de cereales en desarrollo y por tanto en la prevención de la degradación del almidón. La α -glucosidasa, que ha sido identificada repetitivamente entre las posibles dianas de NTRC en endospermo de arroz y trigo, no había sido identificada previamente como diana de Trxs, por lo que podría tratarse de una diana exclusiva de NTRC en el endospermo de semillas de cereales. La α -glucosidasa es una enzima implicada en la degradación del almidón y cuya actividad es abundante durante la fase de germinación de la semilla. Su identificación en semillas de cereales en desarrollo puede indicar que la proteína se produce en esta fase estando presente de forma inactiva hasta la germinación donde su activación podría estar mediada por NTRC, aunque hasta el momento no se ha descrito una regulación redox de la α -glucosidasa. Diversos autores defienden la existencia de ciclos fútiles donde la síntesis y la degradación de almidón tienen lugar simultáneamente tanto en tejidos fotosintéticos como no fotosintéticos, provocando una movilización continua del gránulo de almidón (Stitt and Heldt, 1981; Pozueta-Romero and Akazawa, 1993; Neuhaus et al., 1995; Lozovaya et al., 1996; Sweetlove et al., 1996; Baroja-Fernandez et al., 2003; Bahaji et al., 2011; Fettke et al., 2011). La presencia de la α -glucosidasa en endospermo de semillas de cereales en desarrollo, así como de otras posibles dianas de NTRC implicadas en la degradación del almidón, podría deberse a la existencia de un ciclo fútil de síntesis y degradación del almidón en este tejido. Hay que constatar sin embargo que la posibilidad de una continua movilización del almidón mediante la síntesis y degradación simultánea es motivo de debate en la literatura, habiendo autores que defienden que la

síntesis de almidón no está acompañada de una degradación activa (Zeeman et al., 2002; Geigenberger, 2011).

Del conjunto de proteínas implicadas en el metabolismo del almidón identificadas como posibles dianas de NTRC en endospermo de semillas de cereales se deduce una importante participación de la enzima en la regulación redox dicho metabolismo en este tejido. De este modo NTRC estaría desempeñando un importante papel en la síntesis del almidón de reserva durante el desarrollo de las semillas y en su movilización durante la germinación (Figura IV.1).

Metabolismo de ácidos grasos. La identificación de la enzima acetil-CoA carboxilasa entre las posibles dianas indican la participación de NTRC en la regulación de la síntesis *de novo* de ácidos grasos en endospermo de semillas de cereales. Se conoce que la acetil-CoA carboxilasa plastidial puede ser regulada por oxidorreducción, habiéndose demostrado que las Trxs pueden mediar su activación por reducción *in vitro* (Sasaki et al., 1997), posibilidad confirmada por el hecho de encontrar a esta enzima como posible diana de Trxs en plastos (Montrichard et al., 2009). Del mismo modo, NTRC podría estar implicada en la regulación redox de la acetil-CoA carboxilasa en los amiloplastos del endospermo de las semillas de cereales. Otra de las posibles dianas de NTRC identificadas en endospermo relacionada con el metabolismo de ácidos grasos es la lipoxigenasa, enzima que participa en su modificación oxidativa. Esta enzima está relacionada con procesos de peroxidación lipídica y de respuesta a estrés y también fue identificada como posible diana de Trxs en semillas germinadas de *M. truncatula* (Alkhalfioui et al., 2007). Siendo NTRC una enzima que participa en la protección frente al estrés oxidativo, la posible participación en la regulación de la lipoxigenasa debería ser de carácter inhibitorio.

Metabolismo de aminoácidos. En endospermo de semillas de arroz se han identificado varias enzimas relacionadas con el metabolismo de aminoácidos como posibles dianas de NTRC (2-isopropil malato sintasa, acetolactato sintasa, fenilalanina amonio liasa, N-acetil-gamma-glutamil-fosfato reductasa, sarcosin oxidasa, fumarilacetoacetato hidrolasa, hidroxipiruvato reductasa). De estas enzimas, la fenilalanina amonio liasa ha sido descrita como posible diana de Trxs en el cloroplasto, habiéndose demostrado que su actividad está sujeta a regulación redox (Nishizawa et al., 1979). La posible interacción con estas enzimas sugiere la participación de NTRC en el metabolismo de aminoácidos como la arginina, fenilalanina, glicina, leucina, isoleucina, serina, tirosina, treonina y valina. Ya se había propuesto la participación de NTRC en la regulación de la síntesis de aminoácidos aromáticos (Lepisto et al., 2009), por lo que esta

podría ser una función común de la enzima en tejidos fotosintéticos y heterotróficos. Por otro lado, la identificación de la S-adenosilmetionina sintetasa entre las posibles dianas de NTRC en endospermo de semillas de arroz, sugiere la implicación de la NTRC en la regulación de la síntesis del principal donador de grupos metilo, la S-adenosilmetionina.

Síntesis y transformación de ATP. Se han identificado tres proteínas relacionadas con la síntesis o transformación del ATP: la adenilato quinasa A, la subunidad β de la ATP sintasa mitocondrial y la nucleosido difosfato quinasa 1. Todas han sido identificadas previamente como posibles dianas de Trxs en la mitocondria (Balmer et al., 2004), y en el caso de la ATP sintasa en semillas de *M. truncatula* en germinación (Alkhalfioui et al., 2007). La nucleosido difosfato quinasa 1, carece de residuos de cisteína, lo que indica que no es una diana directa de NTRC. La identificación de la adenilato quinasa A en la elución con NaCl en la cromatografía de afinidad sugiere que la interacción con esta proteína no implica la formación de puentes disulfuro y por tanto una regulación redox mediada por NTRC. En el caso de la subunidad β de la ATP sintasa, del mismo modo que las Trxs regulan su actividad en el cloroplasto (He et al., 2000), NTRC podría estar regulando la actividad de la subunidad ATP sintasa del endospermo de semillas, sin embargo, no se ha demostrado aún la presencia de NTRC en la mitocondria. De ser así, NTRC estaría participando en el control de la producción energética en este tejido heterotrófico.

Síntesis y degradación de proteínas. Entre las posibles dianas de NTRC en endospermo de semillas de cereales se han identificado proteínas relacionadas con la síntesis de proteínas, que participan tanto en la traducción (factores de elongación EF-1 y EF-2, y proteínas ribosomales 60S) como en el plegamiento (HSP70 citosólica y cloroplastídica, chaperonina (HSP60) mitocondrial, proteína disulfuro isomerasa). Tanto factores de elongación como chaperonas HSP aparecían repetitivamente en los experimentos realizados en endospermo de semillas de arroz y trigo, y habían sido identificadas previamente como posibles dianas de Trx en semillas de cereales en desarrollo (Wong et al., 2004; Balmer et al., 2006). Dado que la síntesis de proteínas de reserva es un proceso importante durante el desarrollo de las semillas de cereales, no es sorprendente la posibilidad de que NTRC estuviera participando en la regulación redox de dicho proceso. La degradación de proteínas, y en particular las proteínas de reserva, es un proceso que tiene lugar masivamente durante la germinación de la semilla. La identificación de proteasas como posibles dianas de NTRC en endospermo de semillas en desarrollo podría deberse a que dichas proteasas sean sintetizadas durante la fase de desarrollo en una forma inactiva y requieran activación, posiblemente por reducción, para ser

funcionales durante la germinación. La activación de proteasas, en concreto de tiocalsinas, por reducción mediada por Trxs ha sido demostrada en semillas de trigo en germinación (Besse et al., 1996).

Proteínas de almacenamiento. Las semillas de cereales sintetizan y acumulan en el endospermo proteínas de almacenamiento como reserva de aminoácidos para la síntesis de proteínas requeridas durante la germinación. Diferentes estudios han demostrado que durante la germinación de semillas de cereales las Trxs son las principales responsables de la reducción de proteínas de reserva provocando con ello un incremento en la susceptibilidad frente a proteasas (Kobrehel et al., 1992; Marx et al., 2003). La identificación de proteínas de reserva (alérgenos RA16 y RAG2, proteínas R40c1 y R40g2, o gluteninas) entre las posibles dianas de NTRC en semillas de cereales sugiere, del mismo modo que las Trxs, una posible participación en la movilización de compuestos de reserva durante la germinación.

Estructura celular. La identificación de componentes del citoesqueleto (subunidades 1, 3 y 7 de la actina y las subunidades α y β de la tubulina) así como de un elemento nucleador de la actina (*Formin-like protein 3*) entre las posibles dianas de NTRC en endospermo de semillas de arroz sugieren su participación en la polimerización de dichos elementos y por tanto con la definición de la estructura celular. En cereales se ha relacionado previamente a la actina y la tubulina con Trxs, y se ha demostrado su reducción durante la germinación de semillas que, en el caso de la actina, favorece su polimerización (Wong et al., 2004; Ghezzi, 2005; Alkhalfioui et al., 2007).

Defensa. Los inhibidores de xilanasas y la proteína dirigente (*dirigent-like protein*), identificadas como posibles dianas de NTRC en endospermo de semillas de cereales, participan en defensa frente a patógenos y herbívoros. Los inhibidores de xilanasas previenen la degradación de la pared celular y, aunque poseen un elevado número de residuos de cisteína, no se ha descrito hasta el momento una regulación redox de su actividad.

Respuesta a estrés. Las anexinas son proteínas mediadoras de la señalización por Ca^{2+} que juegan un papel importante en la respuesta a una amplia variedad de estreses abióticos (Gorecka et al., 2007). La Anexina 1 de *Arabidopsis* posee residuos de cisteína conservados susceptibles de S-glutationilación bajo condiciones de estrés (Konopka-Postupolska et al., 2009) y que en cereales podrían ser los responsables de su interacción con NTRC en el endospermo. La identificación de las anexinas P33 y P35 de arroz como posibles dianas de NTRC abre la posibilidad de que NTRC pudiera estar mediando la respuesta a estrés en

endospermo de semillas de cereales. Además se han identificado como posibles dianas proteínas de la familia de las *Universal Stress Protein* y una glutatión transferasa (tipo F) también implicadas en la respuesta a estrés e identificadas previamente como posibles dianas de Trxs en la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Mata-Cabana et al., 2007).

Transducción de señales. Varias proteínas asociadas con la señalización han sido identificadas en este trabajo como posibles dianas de NTRC: una proteína de unión a GTP, la subunidad β de la proteína G, un receptor quinasa, la subunidad calcineurina B y la proteína Rp120 de unión a RNA. Otra de las funciones en las que podría estar implicada NTRC en endospermo de semillas de cereales podría ser la transducción de señales a través de la regulación redox de estas proteínas, que ha sido previamente relacionada con Trxs en semillas (Montrichard et al., 2009).

Procesamiento de DNA y RNA. NTRC podría estar implicada en el procesamiento de DNA y RNA a través de la regulación de topoisomerasas, ribonucleasa H2 C y de proteínas que posean el dominio pentatricopéptido, que han sido identificadas como posibles dianas en semillas de arroz y trigo. Sin embargo, no existen evidencias de que NTRC tenga localización nuclear por lo que la interacción directa con proteínas nucleares como las topoisomerasas no sería posible.

Transporte de proteínas. TOC75 es una proteína integral de membrana que constituye un canal en la membrana externa de plastos para el transporte de proteínas. Estudios previos revelaron su presencia en amiloplastos de semillas de trigo (Balmer et al., 2006). En este trabajo se ha identificado a TOC75 como posible diana de NTRC en endospermo, lo que relaciona a NTRC con el transporte de proteínas hacia el interior del amiloplasto.

Otros. Varias proteínas de la familia citocromo P450 aparecen como posibles dianas de NTRC en endospermo de semillas de arroz. Las proteínas de esta familia median reacciones de oxidación y participan en una amplia variedad de procesos en plantas. Entre ellas se ha identificado una ent-Kaureno oxidasa, enzima implicada en la biosíntesis de giberelinas (Helliwell et al., 1999). Esta hormona tiene un papel fundamental durante la germinación de las semillas de cereales provocando la inducción de la expresión de genes de enzimas hidrolíticas como las α -amilasas, glucanasas y proteasas (Fincher, 1989). La posible participación de NTRC en la regulación de la ent-kaureno oxidasa y por tanto de la síntesis de giberelinas, asignaría un papel importante a NTRC en la inducción de la germinación de semillas de cereales.

Del análisis funcional de las posibles dianas de NTRC identificadas en este trabajo en endospermo de semillas de arroz y trigo se deduce que NTRC no solo estaría desempeñando funciones importantes durante el desarrollo de las semillas, participando en la regulación redox de procesos como la síntesis de compuestos de reserva; sino que además podría jugar un papel esencial en la germinación promoviendo la movilización de dichos compuestos para nutrir el crecimiento de la nueva plántula. Para llegar a la comprensión de las funciones precisas de NTRC en endospermo de semillas de cereales se requiere la realización de estudios de caracterización de su interacción con las posibles dianas y del papel regulador que NTRC ejerce en cada una de ellas.

IV.3. Sacarosa sintasa: posible diana de NTRC en endospermo de semillas de cereales

El análisis de las dianas de NTRC de endospermo pone de manifiesto que uno de los procesos en los que esta enzima parece estar haciendo una función más relevante es la regulación del metabolismo de carbohidratos y, más concretamente, de la síntesis de almidón. Entre estas dianas, en este trabajo hemos realizado un estudio en mayor profundidad de la sacarosa sintasa (SUS). La SUS es una enzima clave en la síntesis de almidón en tejidos heterotróficos, habiéndose identificado dos isoformas en endospermo de semillas de trigo (SUS1 y SUS2) y tres en endospermo de semillas de arroz (SUS1, SUS2 y SUS3) como posibles dianas de NTRC en este tejido. La repetitiva identificación de esta enzima entre los diferentes experimentos realizados convierte a esta enzima en una sólida candidata a ser diana de NTRC dada la posible localización citosólica de ésta en endospermo de semillas de cereales.

La SUS cataliza la degradación de sacarosa hasta UDPG y fructosa, que pueden ser metabolizados para la producción energética o ser incorporados en la ruta de síntesis de polisacáridos como el almidón o la celulosa (Koch, 2004). En los órganos heterotróficos de las plantas esta enzima ejerce un papel fundamental en la canalización de la sacarosa importada hacia la síntesis de almidón y polisacáridos de la pared celular, controlando así la fuerza sumidero de dichos órganos (Chourey and Nelson, 1976; Amor et al., 1995; Zrenner et al., 1995; Chourey et al., 1998; Ruan et al., 2003; Baroja-Fernandez et al., 2009; Li et al., 2013). En semillas de cereales, donde la síntesis de almidón de reserva supone la principal ruta metabólica durante el desarrollo, la SUS adquiere una gran importancia al controlar el primer paso en la conversión de la sacarosa en almidón. Diversos estudios han demostrado la importancia de esta enzima en la producción de almidón en endospermo, de tal modo que la

disminución o el incremento de actividad SUS están directamente relacionados con el contenido de almidón de la semilla (Chourey and Nelson, 1976; Chourey et al., 1998; Li et al., 2013). El papel de la SUS podría ser aún mayor si consideramos la posibilidad de que catalice la conversión directa de sacarosa en ADPG entrando directamente en la ruta de síntesis de almidón (Pozueta-Romero et al., 1991; Baroja-Fernandez et al., 2003; Baroja-Fernandez et al., 2009; Bahaji et al., 2011; Baroja-Fernandez et al., 2012).

La posibilidad de que NTRC esté participando en la regulación redox de una enzima como la SUS, esencial en la síntesis de almidón en endospermo de semillas de cereales, confirmaría su implicación en la regulación de la ruta, previamente propuesta con su participación en la regulación redox de la AGPasa de tejidos fotosintéticos y no fotosintéticos (Michalska et al., 2009).

IV.3.1. El patrón de expresión de los genes *OsSus1*, *OsSus2* y *OsSus3* durante el desarrollo de la semilla no se altera en condiciones de estrés salino.

En este trabajo se ha llevado a cabo un estudio del patrón de expresión de los genes que codifican las isoformas de SUS de arroz identificadas como posibles dianas de NTRC, *OsSus1*, *OsSus2* y *OsSus3*, durante el desarrollo de la semilla de arroz. Los tres genes analizados pertenecen a la familia génica *Sus* de arroz, que está compuesta por siete miembros (*Sus1* a *Sus7*), cada uno de los cuales presenta un perfil de expresión diferencial, pero parcialmente solapante, y una función específica que depende en gran medida del tejido donde se encuentra localizada (Huang et al., 1996; Wang et al., 1999; Hirose et al., 2008; Cho et al., 2011).

El análisis de expresión mediante qPCR (Figura III.3.3.A) demostró un alto nivel de expresión de los tres genes durante todo el desarrollo de la semilla de arroz, siendo más elevada en estadíos iniciales y decreciendo con la maduración. Los niveles de expresión de los genes *Sus* obtenidos se corresponden además con los niveles totales de la enzima detectados durante el desarrollo de la semilla de arroz, que fue mayor en los estadíos iniciales (Figura III.3.3.B). Sin embargo, y de acuerdo con resultados previos (Huang et al., 1996; Hirose et al., 2008), cada gen presentó un patrón de expresión diferencial de acuerdo con su función y localización. De los tres genes analizados, *OsSus1* es el que mostró un menor nivel de expresión durante el desarrollo de la semilla, hasta dos órdenes de magnitud inferior respecto a *OsSus2* y *OsSus3*, alcanzando el máximo nivel en la primera etapa del desarrollo tras la cual disminuyó ligeramente manteniéndose constante en las sucesivas etapas. El máximo nivel de expresión de *OsSus1* al comienzo del desarrollo de la semilla, una etapa caracterizada por la

elevada tasa de división celular, se correspondería con las funciones propuestas para SUS1 que podría estar participando bien en la síntesis de pared celular o en el suministro de hexosas para la producción energética y/o la turgencia de las células del tejido en crecimiento (Hirose et al., 2008). La expresión de *OsSus1* en las sucesivas etapas de llenado de la semilla estaría más relacionada con la función de SUS1 de transporte de azúcares hacia las células del endospermo dada su localización en tejidos vasculares y aleurona de la semilla en desarrollo (Wang et al., 1999). En el caso de *OsSus2* mostró los niveles de expresión más elevados y, a diferencia de *OsSus1* y *OsSus3*, dichos niveles se mantuvieron constantes durante todo el desarrollo de la semilla, lo que contrasta con los datos previos (Huang et al., 1996; Hirose et al., 2008) que muestran unos niveles de *OsSus2* inferiores a los de *OsSus3* y que decrecen drásticamente hacia la mitad del desarrollo de la semilla. En este trabajo se mostró además que la expresión de *OsSus2* es menor en hoja que en semilla. La expresión de *OsSus2* en semilla en desarrollo y en hoja concuerda con la función *hosusekeeping* asignada a SUS2 dada su localización ubicua en la planta (Wang et al., 1999). En patrón de expresión mostrado por *OsSus3* se caracterizó por los elevados niveles de transcrito en el primer estadio del desarrollo de la semilla y por su total ausencia en hoja. Dicho patrón de expresión concuerda además con la localización de SUS3 en semillas de arroz, presente casi exclusivamente en las células del endospermo, donde su función estaría dirigida fundamentalmente hacia la síntesis de almidón (Wang et al., 1999).

Dada la importancia de la SUS en los órganos heterotróficos de la planta, esta enzima está sometida además a regulación a nivel transcripcional. La expresión de los genes *Sus* están influenciados por una enorme variedad de factores ambientales y fisiológicos. Entre ellos, los niveles de azúcares y la concentración de oxígeno del medio son los principales moduladores de la expresión de estos genes (Taliercio and Chourey, 1989; Koch et al., 1992; Koch, 1996; Zeng et al., 1998; Dejardin et al., 1999; Koch et al., 2000; Bologa et al., 2003; Baud et al., 2004). También se ha demostrado que los genes *Sus* responden ante diferentes estreses como son los provocados por las bajas temperaturas (Strand et al., 1997; Ricard et al., 1998; Baud et al., 2004), sequía (Geigenberger et al., 1997; Gordon et al., 1997; Dejardin et al., 1999; Baud et al., 2004), alta salinidad (Gordon et al., 1997; Balibrea et al., 2003; Lu et al., 2010), luz (Ciereszko et al., 2001) y/o heridas (Salanoubat and Belliard, 1989).

En este trabajo nos hemos centrado en la influencia de la salinidad en la expresión de los genes *Sus* dada la importancia de este factor ambiental en el cultivo del arroz en marismas donde la salinidad, especialmente en periodos de sequía, tiene un importante efecto sobre la producción. Para ello cuantificamos mediante qPCR los niveles de transcrito de los genes

OsSus1, *OsSus2* y *OsSus3* en semillas de arroz en desarrollo obtenidas de plantas cultivadas en alta salinidad (2,5 g/L) y los comparamos con los niveles de dichos genes en semillas obtenidas de plantas cultivadas en condiciones normales de baja salinidad. A diferencia de los resultados obtenidos con otras especies, como la soja o el tomate, donde la salinidad altera la expresión de los genes *Sus* dependiendo de la isoforma analizada (Gordon et al., 1997; Balibrea et al., 2003; Lu et al., 2010), los niveles de expresión de los genes *Sus* aquí analizados en las semillas de arroz en desarrollo no variaron en condiciones de alta salinidad (Figura III.3.4). Tan solo se pudo apreciar una alteración significativa (reducción del 64%) de la expresión del gen *OsSus3* en el primer estadio de desarrollo, respecto a su expresión bajo condiciones de baja salinidad (Figura III.3.4.C). Puesto que SUS3 es la isoforma predominante en el endospermo de semillas de arroz, donde su función principal es la canalización de la sacarosa hacia la síntesis de almidón (Wang et al., 1999), la reducción de la expresión de *OsSus3* en condiciones de alta salinidad podría alterar la tasa de síntesis de almidón en este tejido, al menos en la fase inicial de desarrollo de la semilla. Ante la disminución de la actividad SUS3 provocada por la reducción de la expresión de *OsSus3*, podrían darse dos situaciones diferentes. Si las isoformas de SUS en arroz están altamente especializadas como ocurre en el caso del maíz (Chourey et al., 1998), el guisante (Craig et al., 1999; Gordon et al., 1999), la patata (Zrenner et al., 1995) o el algodón (Ruan et al., 2003), donde la mutación en una isoforma específica de SUS provoca un severo fenotipo, el estrés salino podría afectar al desarrollo normal de las semillas de arroz durante la fase inicial de crecimiento, pudiendo afectar con ello a la producción. Sin embargo, teniendo en cuenta el solapamiento de los patrones de expresión de los genes *Sus* en arroz, la alta expresión basal de *OsSus2* durante todo el desarrollo de la semilla, incluso en condiciones de alta salinidad, podrían compensar en parte la disminución de la expresión de *OsSus3* causada por el estrés salino, como ocurre en *Arabidopsis*, donde la mutación de una o dos isoformas no altera el fenotipo respecto al silvestre (Bieniawska et al., 2007). Se requiere por tanto la realización de estudios sobre el contenido de almidón que nos ayude a esclarecer si la reducción en la actividad de una isoforma específica puede ser complementada con otra con la misma localización.

IV.3.2. Nuevo método para la producción de sacarosa sintasa recombinante

Para confirmar la posible regulación redox de la actividad SUS por NTRC se requería la realización de estudios *in vitro* con las enzimas purificadas. El procedimiento habitual para la producción de proteínas recombinantes es, en primer lugar, tratar de expresarlas en *E.coli*.

En este trabajo se trató, como primera opción, de producir las isoformas 1, 2, y 3 de SUS de arroz en *E.coli*. Para ello se clonaron los cDNAs correspondientes en el vector pQE30 y se transformaron en las estirpes de *E.coli* XL1Blue, sistema de expresión utilizado habitualmente con éxito en nuestro laboratorio, y BL21 (DE3), estirpe utilizada en diversos estudios con SUS recombinante que utilizan un sistema bacteriano para la producción de la proteína (Nakai et al., 1997; Nakai et al., 1998; Barratt et al., 2001; Li et al., 2003; Bieniawska et al., 2007). A pesar de los diversos intentos de optimización de la producción bajo diferentes condiciones de cultivo, no se consiguió la expresión de la proteína en ninguno de los dos sistemas (Figura III.3.5), o al menos, no en su forma completa como muestran los análisis *Western blot* en las pruebas de expresión. El tamaño de la proteína recombinante, constituida por unos 800 aa, podría ser el factor limitante para su producción en *E.coli*. Aunque trabajos previos han logrado la expresión de SUS en *E.coli*, en muchos de ellos la producción de la proteína recombinante se asocia a problemas como la escasa cantidad de proteína producida (30 µg/g bacteria) o la baja actividad de la proteína (0,05-1,5 U/mg proteína), debidas bien a la producción de SUS inactiva o a la alteración de sus características bioquímicas causada por la ausencia de la fosforilación de determinados residuos de serina dada la incapacidad de los sistemas bacterianos de realizar las modificaciones post-traduccionales de la proteína propias de plantas. Aunque la SUS desfosforilada es activa, muestra una alteración en la afinidad por el sustrato y en su hidrofobicidad (Huber et al., 1996; Zhang and Chollet, 1997; Winter and Huber, 2000).

Ante las limitaciones que presentan los sistemas bacterianos en la producción eficiente de proteínas eucarióticas, otros autores optaron por la producción heteróloga de proteínas recombinantes en sistemas eucarióticos como son las levaduras (Romer et al., 2004) o a la purificación de la proteína directamente de los extractos vegetales (Delmer, 1972; Morell and Copeland, 1985; Nguyen-Quoc et al., 1990; Ross and Davies, 1992; Guerin and Carbonero, 1997; Tanase and Yamaki, 2000; Schafer et al., 2005), si bien, este último sistema requiere de múltiples pasos de purificación con métodos convencionales que no garantizan la obtención de la proteína en estado homogéneo. Sin embargo, en otros trabajos donde se utilizó *E. coli* para la expresión de SUS recombinante, se consiguió la producción de la proteína activa y en cantidades considerables (Barratt et al., 2001; Baroja-Fernandez et al., 2003; Bieniawska et al., 2007; Baroja-Fernandez et al., 2012), permitiendo incluso en el caso de la SUS1 de *Arabidopsis* su cristalización (Zheng et al., 2011). Cabe destacar que la gran mayoría de los trabajos en los que se ha conseguido producir la SUS recombinante a partir de sistemas bacterianos, la proteína expresada pertenece a plantas dicotiledóneas. Siendo una proteína de gran

importancia en semillas de cereales, resulta sorprendente la escasez de referencias sobre la expresión heteróloga de SUS de cereales.

Ante la imposibilidad de la expresión de las SUS de arroz en *E. coli*, en este trabajo se ha desarrollado una nueva metodología para la producción heteróloga de SUS recombinante basada en la expresión transitoria de proteínas en *Nicotiana benthamiana*. De este modo, utilizando un sistema eucariótico para la producción de SUS se salvan las limitaciones de los sistemas bacterianos, ya que permite la expresión y producción de proteínas complejas que requieren modificaciones post-traduccionales, y de la purificación de la proteína a partir de extractos vegetales, ya que la producción de proteínas recombinantes posibilita la obtención de fracciones de gran pureza. Con este sistema de producción en *N. benthamiana* se obtuvieron en cada purificación cantidades considerables de SUS activa (unos 0,4 mg de enzima a partir de 2,5 g del material vegetal), con una actividad específica entre 0,5 y 7 U/mg proteína, dependiendo de la isoforma, comparable con las actividades específicas de SUS purificada de plantas dicotiledóneas como guisante (Barratt et al., 2001), *Arabidopsis* (Bieniawska et al., 2007) o patata (Romer et al., 2004).

La purificación de SUS de arroz a partir de su expresión transitoria en *N. benthamiana* desarrollada en este trabajo constituye por tanto un sistema eficaz de expresión y purificación de SUS recombinante de cereales.

IV.3.3. Las isoformas OsSUS1, OsSUS2 y OsSUS3 difieren en sus propiedades bioquímicas

Mediante la expresión de los cDNAs correspondientes a los genes *OsSus1*, *OsSus2* y *OsSus3* de arroz en *N. benthamiana* y su posterior purificación por cromatografía de afinidad mediante cola de histidina, se pudieron obtener preparaciones de gran pureza de las isoformas OsSUS1, OsSUS2 y OsSUS3, respectivamente. A partir de estas preparaciones se realizaron estudios bioquímicos para su caracterización dada la ausencia de información referente a la actividad específica de dichas isoformas de SUS en arroz. Los datos de actividad SUS existentes hasta el momento en arroz son actividades totales de extractos crudos de semillas en desarrollo y/o en germinación (Wang et al., 1999; Hirose et al., 2008) o datos relativos de actividad de diferentes isoformas parcialmente purificadas (Yen et al., 1994).

Aunque las tres isoformas SUS de arroz analizadas mostraron comportamientos bioquímicos similares, los resultados obtenidos para la isoforma OsSUS1 varían ligeramente de aquellos obtenidos para las isoformas OsSUS2 y OsSUS3, que comparten una mayor similitud. La isoforma OsSUS1, que mostró una actividad (tanto de síntesis como de rotura de sacarosa)

notablemente más elevada que OsSUS2 y OsSUS3 (Figura III.3.13), presentó además un pH óptimo de reacción en sentido de rotura ligeramente más ácido (Figura III.3.12) y, aunque las afinidades por sacarosa y fructosa fueron similares para las tres isoformas, las afinidades de OsSUS1 por UDP y UDPG fueron menores que las presentadas por OsSUS2 y OsSUS3 (Figura III.3.13.E). La inhibición por fructosa mostrada por las tres isoformas era también mucho más acusada en el caso de OsSUS1 (Figura III.3.14). Tales diferencias podrían ser el resultado de la divergencia evolutiva entre dichas isoformas puesto que, aunque pertenecen al mismo grupo filogenético (Grupo-1 específico de monocotiledóneas (Figura III.3.2)), la isoforma OsSUS1 se localiza en un subgrupo diferente. Además, los diferentes comportamientos entre isoformas sugieren la posibilidad de cada una de ellas ejerza funciones diferentes, como se había propuesto previamente en varias especies de cereales incluyendo el arroz (Wang et al., 1999; Hirose et al., 2008) o el maíz (Koch et al., 1992).

Estudios previos realizados en maíz (Huber et al., 1996) y en soja verde (*Vigna radiata*) (Nakai et al., 1998) demostraron que la fosforilación de la SUS provoca un aumento en la actividad enzimática en el sentido de rotura, incrementando las afinidades por la sacarosa y por el UDP hasta 2,5 y 5 veces, respectivamente. Según los resultados obtenidos por Huber et al. en 1996, las afinidades de las isoformas SUS1, SUS2 y SUS3 aquí obtenidas para la sacarosa y el UDP estarían en el rango de la enzima no fosforilada, lo que sorprende por el hecho de que las diferentes isoformas de arroz se produjeron en un sistema eucariota, suponiéndose por tanto la fosforilación de la enzima. Sin embargo, comparadas con los resultados obtenidos por Nakai et al. en 1998, las afinidades de las isoformas de arroz por la sacarosa son muy superiores a la de la enzima fosforilada, indicando que las isoformas ensayadas se encuentran en un estado fosforilado. Es más, la afinidad por la sacarosa de las tres isoformas de arroz es mayor que la descrita para la SUS1 recombinante de patata expresada en levaduras (Romer et al., 2004) o que algunas de las isoformas de *Arabidopsis* y guisante recombinantes expresadas en *E. coli* (Barratt et al., 2001; Bieniawska et al., 2007; Baroja-Fernandez et al., 2012).

Aunque se considera que el UDP es el nucleósido difosfato preferido para la SUS, numerosos estudios han demostrado que el ADP actúa como una molécula aceptora eficaz para producir ADPG (Murata et al., 1966; Delmer, 1972; Silvius and Snyder, 1979; Nakai et al., 1998; Zervosen et al., 1998; Baroja-Fernandez et al., 2003; Romer et al., 2004; Baroja-Fernandez et al., 2009; Baroja-Fernandez et al., 2012). En muchos de ellos se sugiere además que dicha capacidad permite a la SUS participar, al menos en parte, en la conversión directa de la sacarosa en ADPG para la síntesis de almidón tanto en células autotróficas como heterotróficas (Pozueta-Romero et al., 1991; Baroja-Fernandez et al., 2003; Munoz et al., 2005;

Baroja-Fernandez et al., 2009; Bahaji et al., 2011; Baroja-Fernandez et al., 2012). La posibilidad de esta ruta alternativa para la síntesis de almidón ha abierto un debate en la literatura que dura ya más de 20 años (Okita, 1992; Baroja-Fernandez et al., 2001; Baroja-Fernández et al., 2005; Neuhaus et al., 2005; Kirchberger et al., 2008; Barratt et al., 2009; Streb et al., 2009; Bahaji et al., 2011; Geigenberger, 2011). En este trabajo hemos querido comprobar la capacidad de las tres isoformas de SUS de arroz purificadas de utilizar ADP y ADPG como sustrato en las reacciones en sentido de rotura y síntesis de sacarosa, respectivamente. Las tres isoformas mostraron una notable preferencia por el uso de UDP y UDPG como sustratos frente a ADP y ADPG, con los que presentaba alrededor de un 20% de la actividad enzimática (Figura III.3.15). Con ello se demuestra que, aunque pueden usar otros nucleósidos difosfato, las isoformas OsSUS1, OsSUS2 y OsSUS3 no son capaces de utilizarlos tan eficientemente como el UDP. Aunque estos datos no sostienen la hipótesis de que la SUS sea la responsable directa de la conversión de sacarosa en ADPG en el citosol para la síntesis de almidón, al menos en las células de endospermo de cereales, la utilización *in vivo* de UDP o ADP por la SUS, va a depender de las concentraciones citosólicas de dichos nucleósidos difosfato, dado que se ha demostrado que la presencia de UDP no inhibe la capacidad de utilización de ADP por la enzima (Pozueta-Romero et al., 1991).

IV.3.4. La actividad SUS está modulada por el estado redox

La identificación de la SUS entre las posibles dianas de NTRC en endospermo de semillas de cereales sugería la existencia de grupos tiólicos implicados en la formación reversible de puentes disulfuro que actuarían como mecanismo de regulación redox de la actividad. Estudios previos habían demostrado que la actividad SUS en sentido de rotura de sacarosa está sujeta a regulación redox, teniendo un efecto positivo los agentes reductores y negativo los oxidantes (Pontis et al., 1981; Marino et al., 2008). Estudios realizados en soja identificaron el residuo de cisteína C264 como una de las cisteínas implicadas en la regulación redox de la actividad SUS mediante el establecimiento de un puente disulfuro con un residuo de cisteína del péptido A derivado del gen ENOD40 (Rohrig et al., 2004). Dicha interacción, favorecida bajo condiciones oxidantes, protege a la enzima de la inactivación por oxidación irreversible de dicho residuo de cisteína y favorece además su actividad enzimática en sentido de degradación de la sacarosa. Sin embargo, este residuo de cisteína solamente se encuentra conservado en algunas especies dicotiledóneas, estando ausente por tanto en cereales. Mediante comparación de secuencias, pudimos comprobar que existían residuos de cisteína conservados en SUS de dicotiledóneas que estaban ausentes en las enzimas de cereales y

viceversa, indicando bien la existencia de diferentes mecanismos de regulación redox o bien la participación de diferentes residuos de cisteína en esta regulación. En el caso concreto del residuo C264 de la SUS de soja, la regulación redox mediada por factores de nodulación (ENOD40) podría interpretarse como un mecanismo exclusivo de leguminosas, sin embargo, la identificación de homólogos de ENOD40 en especies no leguminosas como el tabaco (van de Sande et al., 1996) o el arroz (Kouchi et al., 1999) no descartan la existencia de mecanismos de regulación redox similares en estas especies.

En este trabajo se quiso comprobar la posible modulación de la actividad SUS en función del estado redox de la enzima en endospermo de cereales a través del estudio de la isoformas OsSUS1, OsSUS2 y OsSUS3 identificadas en este tejido como posibles dianas de NTRC. La primera evidencia de la dependencia del estado redox para su funcionamiento se detectó en el proceso de obtención de la tres isoformas SUS recombinantes de arroz, dado el requerimiento de agentes reductores para su purificación, sin los que la proteína agrega de forma irreversible (Figura III.3.8). El estado redox de las SUS de arroz posiblemente influya en la conformación de la proteína de modo que en un estado oxidado se favorezca su agregación. En este trabajo se confirmó que el estado redox de la proteína afecta también a la actividad (en el sentido de rotura) de las isoformas OsSUS1, OsSUS2 y OsSUS3 purificadas. La oxidación de las proteínas SUS, que habían sido obtenidas en estado reducido, mediante un tratamiento con un agente oxidante como el peróxido de hidrógeno provocó la disminución de su actividad, aunque en diferente medida para cada isoforma. OsSUS1 fue la que presentó la mayor disminución de la actividad tras el tratamiento de oxidación, hasta un 60% respecto a la actividad de la proteína reducida, mientras que OsSUS2 y OsSUS3 disminuyeron su actividad tan solo un 10% (Figura III.3.16). Sin embargo, el tratamiento con un agente reductor (DTT) no provocó recuperación alguna de actividad en ninguna de las tres isoformas, como se había demostrado previamente en SUS de nódulos de guisante (Marino et al., 2008). Los diferentes comportamientos de estas isoformas frente a la oxidación podrían deberse a la divergencia evolutiva entre ellas dado que, como se explicó anteriormente, aunque pertenecen al mismo grupo evolutivo, OsSUS1 se encuentra filogenéticamente más alejado de OsSUS2 y OsSUS3, entre las que la distancia evolutiva es menor y, como se muestra en este trabajo, presentan comportamientos más similares. Además, las distintas funciones propuestas para cada isoforma (Wang et al., 1999) hará que requieran diferentes mecanismos reguladores de su actividad o diferente necesidad de modulación en respuesta a variaciones de las condiciones fisiológicas y/o ambientales. El uso de una concentración elevada del agente oxidante o la utilización de enzimas recombinantes podrían ser la causa de la falta de reversión por

reducción de la actividad tras la oxidación de las isoformas SUS, por lo que no se podría descartar la oxidación reversible de la proteína *in vivo* como mecanismo de regulación de su actividad. De hecho, ensayos de oxidorreducción de SUS en extractos proteicos de hojas de arroz demostraron que tras la oxidación de la proteína, el tratamiento con un agente reductor, en este caso el DTT, fue capaz de recuperar, al menos en parte, la actividad SUS en el sentido de rotura de sacarosa (Figura III.3.17). La modulación redox de la actividad SUS no se detectó sin embargo en los ensayos de oxidorreducción realizados en extractos proteicos de endospermo de semillas de arroz en desarrollo, donde la actividad SUS no varió tras los tratamientos con agentes reductores ni oxidantes. El diferente comportamiento frente a la oxidorreducción en extractos de hoja y de endospermo de semillas de arroz podría deberse a la abundancia de las diferentes isoformas SUS en cada tejido. Así en el endospermo de semillas de arroz en desarrollo las isoformas predominantes son SUS2 y SUS3, que apenas modifican su actividad según su estado redox; mientras que en hojas de arroz las isoformas predominantes son SUS1 y SUS2. Aunque SUS2 no varía su actividad, SUS1 sí responde notablemente en función de su estado redox.

V. CONCLUSIONES

1. El gen *NtrC* se expresa en endospermo de semillas de cereales, sin embargo en este tejido la proteína presenta características peculiares respecto a la de tejidos fotosintéticos. La NTRC de endospermo tiene los módulos NTR y Trx característicos de la enzima pero presenta mayor tamaño y posible localización citosólica, no sólo plastidial. Las características peculiares de NTRC de endospermo pueden deberse a un procesamiento alternativo en la región 5' del mensajero del gen en este tejido.
2. La identificación de proteínas que interaccionan con NTRC en endospermo de semillas de cereales revelan su posible participación en una amplia variedad de procesos que incluyen el metabolismo de carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos; síntesis y transformación de ATP; síntesis y degradación de proteínas; entre otros. Del análisis de estas dianas se deduce que la función más relevante de NTRC en este tejido es el metabolismo del almidón, pudiendo participar tanto en su síntesis como en su degradación.
3. Con todas las aproximaciones utilizadas se han identificado tres isoformas de sacarosa sintasa como posibles dianas de NTRC en endospermo de semillas de cereales. Los genes que codifican estas isoformas *OsSus1*, *OsSus2* y *OsSus3* se expresan durante todo el desarrollo de las semillas de arroz.
4. La metodología de expresión transitoria de las proteínas recombinantes SUS de arroz en *Nicotiana benthamiana* desarrollada en este trabajo constituyen un sistema de expresión heterólogo eficiente que ha permitido la obtención de preparaciones de estas enzimas parcialmente purificadas y catalíticamente activas.
5. Las enzimas recombinantes SUS1, SUS2 y SUS3 de arroz, expresadas en *N. benthamiana*, presentan regulación redox de su actividad. Sin embargo, no se ha podido establecer la participación de NTRC en esta regulación.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Aarti, P. D., R. Tanaka, et al. (2006). "Effects of oxidative stress on chlorophyll biosynthesis in cucumber (*Cucumis sativus*) cotyledons." *Physiologia Plantarum* 128(1): 186-197.
- Aguilar, M. (2001). Cultivo del arroz en el Sur de España.
- Alkhalfioui, F., M. Renard, et al. (2007). "Thioredoxin-linked proteins are reduced during germination of *Medicago truncatula* seeds." *Plant Physiol* 144(3): 1559-1579.
- Amor, Y., C. H. Haigler, et al. (1995). "A membrane-associated form of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(20): 9353-9357.
- Apel, K. and H. Hirt (2004). "Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction." *Annu Rev Plant Biol* 55: 373-399.
- Avigad, G. and Y. Milner (1966). "UDP-glucose: Fructose transglucosylase from sugar beet roots." *Methods Enzymol* 8: 341-345.
- Azama, K., S. Abe, et al. (2003). "Lysine-containing proteins in maize endosperm: a major contribution from cytoskeleton-associated carbohydrate-metabolizing enzymes." *Planta* 217(4): 628-638.
- Azoulay-Zohar, H., A. Israelson, et al. (2004). "In self-defence: hexokinase promotes voltage-dependent anion channel closure and prevents mitochondria-mediated apoptotic cell death." *Biochem J* 377(Pt 2): 347-355.
- Bahaji, A., J. Li, et al. (2011). "Arabidopsis thaliana mutants lacking ADP-glucose pyrophosphorylase accumulate starch and wild-type ADP-glucose content: further evidence for the occurrence of important sources, other than ADP-glucose pyrophosphorylase, of ADP-glucose linked to leaf starch biosynthesis." *Plant Cell Physiol* 52(7): 1162-1176.
- Bailly, C. (2004). "Active oxygen species and antioxidants in seed biology." *Seed Science Research* 14(02): 93-107.
- Balibrea, M. E., J. Cuartero, et al. (2003). "Sucrolytic activities during fruit development of *Lycopersicon* genotypes differing in tolerance to salinity." *Physiol Plant* 118(1): 38-46.
- Balmer, Y., W. H. Vensel, et al. (2006). "A complete ferredoxin/thioredoxin system regulates fundamental processes in amyloplasts." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(8): 2988-2993.
- Balmer, Y., W. H. Vensel, et al. (2006). "Proteome of amyloplasts isolated from developing wheat endosperm presents evidence of broad metabolic capability." *J Exp Bot* 57(7): 1591-1602.
- Balmer, Y., W. H. Vensel, et al. (2004). "Thioredoxin links redox to the regulation of fundamental processes of plant mitochondria." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(8): 2642-2647.
- Ball, S. G. and M. K. Morell (2003). "From bacterial glycogen to starch: understanding the biogenesis of the plant starch granule." *Annu Rev Plant Biol* 54: 207-233.
- Ballicora, M., A. Iglesias, et al. (2004). "ADP-Glucose Pyrophosphorylase: A Regulatory Enzyme for Plant Starch Synthesis." *Photosynthesis Research* 79(1): 1-24.

- Ballicora, M. A., J. B. Frueauf, et al. (2000). "Activation of the potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase by thioredoxin." *J Biol Chem* 275(2): 1315-1320.
- Baroja-Fernandez, E., F. J. Munoz, et al. (2001). "Reappraisal of the currently prevailing model of starch biosynthesis in photosynthetic tissues: a proposal involving the cytosolic production of ADP-glucose by sucrose synthase and occurrence of cyclic turnover of starch in the chloroplast." *Plant Cell Physiol* 42(12): 1311-1320.
- Baroja-Fernandez, E., F. J. Munoz, et al. (2012). "Sucrose synthase activity in the *sus1/sus2/sus3/sus4* Arabidopsis mutant is sufficient to support normal cellulose and starch production." *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(1): 321-326.
- Baroja-Fernandez, E., F. J. Munoz, et al. (2009). "Enhancing sucrose synthase activity in transgenic potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers results in increased levels of starch, ADPglucose and UDPglucose and total yield." *Plant Cell Physiol* 50(9): 1651-1662.
- Baroja-Fernandez, E., F. J. Munoz, et al. (2003). "Sucrose synthase catalyzes the de novo production of ADPglucose linked to starch biosynthesis in heterotrophic tissues of plants." *Plant Cell Physiol* 44(5): 500-509.
- Baroja-Fernández, E., F. J. Muñoz, et al. (2005). "Response to Neuhaus et al.: No need to shift the paradigm on the metabolic pathway to transitory starch in leaves." *Trends in plant science* 10(4): 156-158.
- Barratt, D. H., L. Barber, et al. (2001). "Multiple, distinct isoforms of sucrose synthase in pea." *Plant Physiol* 127(2): 655-664.
- Barratt, D. H., P. Derbyshire, et al. (2009). "Normal growth of Arabidopsis requires cytosolic invertase but not sucrose synthase." *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Barrero-Sicilia, C., S. Hernando-Amado, et al. (2011). "Structure, expression profile and subcellular localisation of four different sucrose synthase genes from barley." *Planta* 234(2): 391-403.
- Baud, S., M. N. Vaultier, et al. (2004). "Structure and expression profile of the sucrose synthase multigene family in Arabidopsis." *J Exp Bot* 55(396): 397-409.
- Baulcombe, D. C. and D. Buffard (1983). "Gibberellic-acid-regulated expression of α -amylase and six other genes in wheat aleurone layers." *Planta* 157(6): 493-501.
- Beatty, M. K., A. Rahman, et al. (1999). "Purification and molecular genetic characterization of ZPU1, a pullulanase-type starch-debranching enzyme from maize." *Plant Physiol* 119(1): 255-266.
- Beckles, D. M., A. M. Smith, et al. (2001). "A cytosolic ADP-glucose pyrophosphorylase is a feature of graminaceous endosperms, but not of other starch-storing organs." *Plant Physiol* 125(2): 818-827.
- Becraft, P. W. and G. Yi (2011). "Regulation of aleurone development in cereal grains." *J Exp Bot* 62(5): 1669-1675.
- Belitz, H.-D. and W. Grosch (1982). *Food Chemistry*. Berlin/Heidelberg/New York, Springer-Verlag. .

- Bernal-Bayard, P., M. Hervas, et al. (2012). "Electron transfer pathways and dynamics of chloroplast NADPH-dependent thioredoxin reductase C (NTRC)." *J Biol Chem* 287(40): 33865-33872.
- Besse, I., J. H. Wong, et al. (1996). "Thiocalcin: a thioredoxin-linked, substrate-specific protease dependent on calcium." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(8): 3169-3175.
- Bewley, J. D. (1997). "Seed Germination and Dormancy." *The Plant Cell* 9: 1055-1066.
- Bieniawska, Z., D. H. Paul Barratt, et al. (2007). "Analysis of the sucrose synthase gene family in Arabidopsis." *Plant J* 49(5): 810-828.
- Bologa, K. L., A. R. Fernie, et al. (2003). "A bypass of sucrose synthase leads to low internal oxygen and impaired metabolic performance in growing potato tubers." *Plant Physiol* 132(4): 2058-2072.
- Bosnes, M., F. Weideman, et al. (1992). "Endosperm differentiation in barley wild-type and sex mutants." *Plant Journal* 2: 661-674.
- Buchanan, B. B., P. P. Kalberer, et al. (1967). "Ferredoxin-activated fructose diphosphatase in isolated chloroplasts." *Biochem Biophys Res Commun* 29(1): 74-79.
- Buchanan, B. B., P. Schurmann, et al. (2002). "The ferredoxin/thioredoxin system: from discovery to molecular structures and beyond." *Photosynth Res* 73(1-3): 215-222.
- Bullock, W., J. Fernandez, et al. (1987). "XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with beta-galactosidase selection." *Biotechniques* 5(4): 376-379.
- Caliskan, M. and A. C. Cuming (1998). "Spatial specificity of H₂O₂-generating oxalate oxidase gene expression during wheat embryo germination." *Plant J* 15(2): 165-171.
- Cardini, C. E., L. F. Leloir, et al. (1955). "The biosynthesis of sucrose." *J Biol Chem* 214(1): 149-155.
- Carlson, S. J. and P. S. Chourey (1996). "Evidence for plasma membrane-associated forms of sucrose synthase in maize." *Mol Gen Genet* 252(3): 303-310.
- Carlson, S. J., P. S. Chourey, et al. (2002). "Gene expression studies on developing kernels of maize sucrose synthase (SuSy) mutants show evidence for a third SuSy gene." *Plant Mol Biol* 49(1): 15-29.
- Ceccarelli, E. A., A. K. Arakaki, et al. (2004). "Functional plasticity and catalytic efficiency in plant and bacterial ferredoxin-NADP(H) reductases." *Biochim Biophys Acta* 1698(2): 155-165.
- Cejudo, F. J., J. Ferrandez, et al. (2012). "The function of the NADPH thioredoxin reductase C-2-Cys peroxiredoxin system in plastid redox regulation and signalling." *FEBS Lett* 10: 10.
- Ciereszko, I., H. Johansson, et al. (2001). "Sucrose and light regulation of a cold-inducible UDP-glucose pyrophosphorylase gene via a hexokinase-independent and abscisic acid-insensitive pathway in Arabidopsis." *Biochem J* 354(Pt 1): 67-72.
- Craig, J., P. Barratt, et al. (1999). "Mutations at the rug4 locus alter the carbon and nitrogen metabolism of pea plants through an effect on sucrose synthase." *The Plant Journal* 17(4): 353-362.

- Czechowski, T., R. P. Bari, et al. (2004). "Real-time RT-PCR profiling of over 1400 Arabidopsis transcription factors: unprecedented sensitivity reveals novel root- and shoot-specific genes." *Plant J* 38(2): 366-379.
- Chen, A., S. He, et al. (2012). "Analyses of the sucrose synthase gene family in cotton: structure, phylogeny and expression patterns." *BMC Plant Biol* 12: 85.
- Cho, J. I., H. B. Kim, et al. (2011). "Identification and characterization of the duplicate rice sucrose synthase genes OsSUS5 and OsSUS7 which are associated with the plasma membrane." *Mol Cells* 31(6): 553-561.
- Chourey, P. S. and O. E. Nelson (1976). "The enzymatic deficiency conditioned by the shrunken-1 mutations in maize." *Biochem Genet* 14(11-12): 1041-1055.
- Chourey, P. S., E. W. Taliercio, et al. (1998). "Genetic evidence that the two isozymes of sucrose synthase present in developing maize endosperm are critical, one for cell wall integrity and the other for starch biosynthesis." *Mol Gen Genet* 259(1): 88-96.
- Dale, E. M. and T. L. Housley (1986). "Sucrose synthase activity in developing wheat endosperms differing in maximum weight." *Plant Physiol* 82(1): 7-10.
- Dejardin, A., L. N. Sokolov, et al. (1999). "Sugar/osmoticum levels modulate differential abscisic acid-independent expression of two stress-responsive sucrose synthase genes in Arabidopsis." *Biochem J* 344 Pt 2: 503-509.
- Delaunay, A., D. Pflieger, et al. (2002). "A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation." *Cell* 111(4): 471-481.
- Delmer, D. P. (1972). "The purification and properties of sucrose synthetase from etiolated Phaseolus aureus seedlings." *J Biol Chem* 247(12): 3822-3828.
- Delledonne, M., Y. Xia, et al. (1998). "Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance." *Nature* 394(6693): 585-588.
- Denyer, K., F. Dunlap, et al. (1996). "The Major Form of ADP-Glucose Pyrophosphorylase in Maize Endosperm Is Extra-Plastidial." *Plant Physiology* 112(2): 779-785.
- Doehlert, D. C. (1987). "Substrate inhibition of maize endosperm sucrose synthase by fructose and its interaction with glucose inhibition." *Plant Science* 52(3): 153-157.
- Dominguez, F. and F. J. Cejudo (1995). "Pattern of endoproteolysis following wheat grain germination." *Physiologia Plantarum* 95(2): 253-259.
- Domínguez, F. and F. J. Cejudo (1998). "Germination-related genes encoding proteolytic enzymes are expressed in the nucellus of developing wheat grains." *The Plant Journal* 15(4): 569-574.
- Duncan, K. A., S. C. Hardin, et al. (2006). "The three maize sucrose synthase isoforms differ in distribution, localization, and phosphorylation." *Plant Cell Physiol* 47(7): 959-971.
- Duncan, K. A. and S. C. Huber (2007). "Sucrose Synthase Oligomerization and F-actin Association are Regulated by Sucrose Concentration and Phosphorylation." *Plant and Cell Physiology* 48(11): 1612-1623.

- Dupont, F. M. (2008). "Metabolic pathways of the wheat (*Triticum aestivum*) endosperm amyloplast revealed by proteomics." *BMC Plant Biol* 8: 39.
- Echeverria, E. and T. Humphreys (1985). "Glucose control of sucrose synthase in the maize scutellum." *Phytochemistry* 24(12): 2851-2855.
- El-Maarouf-Bouteau, H. and C. Bailly (2008). "Oxidative signaling in seed germination and dormancy." *Plant Signal Behav* 3(3): 175-182.
- Elling, L. (1995). "Effect of metal ions on sucrose synthase from rice grains--a study on enzyme inhibition and enzyme topography." *Glycobiology* 5(2): 201-206.
- Emanuelsson, O., H. Nielsen, et al. (1999). "ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites." *Protein Sci* 8(5): 978-984.
- Fath, A., P. Bethke, et al. (2002). "Active oxygen and cell death in cereal aleurone cells." *J Exp Bot* 53(372): 1273-1282.
- Fettke, J., I. Malinova, et al. (2011). "Glucose-1-phosphate transport into protoplasts and chloroplasts from leaves of *Arabidopsis*." *Plant Physiol* 155(4): 1723-1734.
- Fincher, G. B. (1989). "Molecular and Cellular Biology Associated with Endosperm Mobilization in Germinating Cereal Grains." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40(1): 305-346.
- Fischer, K. and A. Weber (2002). "Transport of carbon in non-green plastids." *Trends in plant science* 7(8): 345-351.
- Foyer, C. H. and G. Noctor (2009). "Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications." *Antioxid Redox Signal* 11(4): 861-905.
- Fu, H., S. Y. Kim, et al. (1995). "High-level tuber expression and sucrose inducibility of a potato *Sus4* sucrose synthase gene require 5' and 3' flanking sequences and the leader intron." *Plant Cell* 7(9): 1387-1394.
- Fu, H. and W. D. Park (1995). "Sink- and vascular-associated sucrose synthase functions are encoded by different gene classes in potato." *Plant Cell* 7(9): 1369-1385.
- Geigenberger, P. (2011). "Regulation of starch biosynthesis in response to a fluctuating environment." *Plant Physiol* 155(4): 1566-1577.
- Geigenberger, P., A. Kolbe, et al. (2005). "Redox regulation of carbon storage and partitioning in response to light and sugars." *J Exp Bot* 56(416): 1469-1479.
- Geigenberger, P., R. Reimholz, et al. (1997). "Regulation of sucrose and starch metabolism in potato tubers in response to short-term water deficit." *Planta* 201(4): 502-518.
- Geigenberger, P. and M. Stitt (1993). "Sucrose synthase catalyses a readily reversible reaction in vivo in developing potato tubers and other plant tissues." *Planta* 189(3): 329-339.
- Gerrits, N., S. C. Turk, et al. (2001). "Sucrose metabolism in plastids." *Plant Physiol* 125(2): 926-934.
- Ghezzi, P. (2005). "Regulation of protein function by glutathionylation." *Free Radic Res* 39(6): 573-580.

- Ginzinger, D. G. (2002). "Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream." *Exp Hematol* 30(6): 503-512.
- Gordon, A. J., F. R. Minchin, et al. (1999). "Sucrose synthase in legume nodules is essential for nitrogen fixation." *Plant Physiol* 120(3): 867-878.
- Gordon, A. J., F. R. Minchin, et al. (1997). "Stress-Induced Declines in Soybean N₂ Fixation Are Related to Nodule Sucrose Synthase Activity." *Plant Physiol* 114(3): 937-946.
- Gorecka, K. M., K. Trebacz, et al. (2007). "[Participation of annexin At1 in plant response to abiotic stress]." *Postepy Biochem* 53(2): 154-158.
- Gray, K. A., L. Zhao, et al. (2006). "Bioethanol." *Curr Opin Chem Biol* 10(2): 141-146.
- Green, T. W. and L. C. Hannah (1998). "Adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase, a rate-limiting step in starch biosynthesis." *Physiologia Plantarum* 103(4): 574-580.
- Guerin, J. and P. Carbonero (1997). "The Spatial Distribution of Sucrose Synthase Isozymes in Barley." *Plant Physiol* 114(1): 55-62.
- Hagglund, P., J. Bunkenborg, et al. (2008). "Identification of thioredoxin disulfide targets using a quantitative proteomics approach based on isotope-coded affinity tags." *J Proteome Res* 7(12): 5270-5276.
- Haigler, C. H., M. Ivanova-Datcheva, et al. (2001). "Carbon partitioning to cellulose synthesis." *Plant Mol Biol* 47(1-2): 29-51.
- Halayko, A. J., R. D. Hill, et al. (1986). "Characterization of the interaction of barley α -amylase II with an endogenous α -amylase inhibitor from barley kernels." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 873(1): 92-101.
- Halford, N. G., S. Hey, et al. (2003). "Metabolic signalling and carbon partitioning: role of Snf1-related (SnRK1) protein kinase." *J Exp Bot* 54(382): 467-475.
- Hamabata, A., M. Garcia-Maya, et al. (1988). "Kinetics of the Acidification Capacity of Aleurone Layer and Its Effect upon Solubilization of Reserve Substances from Starchy Endosperm of Wheat." *Plant Physiol* 86(3): 643-644.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *J Mol Biol* 166(4): 557-580.
- Hannah, L. C. and M. James (2008). "The complexities of starch biosynthesis in cereal endosperms." *Curr Opin Biotechnol* 19(2): 160-165.
- Hardin, S. C., K. A. Duncan, et al. (2006). "Determination of structural requirements and probable regulatory effectors for membrane association of maize sucrose synthase 1." *Plant Physiol* 141(3): 1106-1119.
- Hardin, S. C. and S. C. Huber (2004). "Proteasome activity and the post-translational control of sucrose synthase stability in maize leaves." *Plant Physiol Biochem* 42(3): 197-208.
- Hardin, S. C., G. Q. Tang, et al. (2003). "Phosphorylation of sucrose synthase at serine 170: occurrence and possible role as a signal for proteolysis." *Plant J* 35(5): 588-603.
- Hardy, D. J. and J. W. Payne (1991). "Analysis of the peptide carrier in the scutellum of barley embryos by photoaffinity labelling." *Planta* 186(1): 44-51.

- He, X., J. C. Anderson, et al. (2004). "Silencing of subfamily I of protein phosphatase 2A catalytic subunits results in activation of plant defense responses and localized cell death." *Plant J* 38(4): 563-577.
- He, X., M. Miginiac-Maslow, et al. (2000). "Mechanism of activation of the chloroplast ATP synthase. A kinetic study of the thiol modulation of isolated ATPase and membrane-bound ATP synthase from spinach by *Escherichia coli* thioredoxin." *J Biol Chem* 275(18): 13250-13258.
- Helliwell, C. A., A. Poole, et al. (1999). "Arabidopsis ent-kaurene oxidase catalyzes three steps of gibberellin biosynthesis." *Plant Physiol* 119(2): 507-510.
- Hemery, Y., X. Rouau, et al. (2007). "Dry processes to develop wheat fractions and products with enhanced nutritional quality." *Journal of Cereal Science* 46(3): 327-347.
- Hendriks, J. H., A. Kolbe, et al. (2003). "ADP-glucose pyrophosphorylase is activated by posttranslational redox-modification in response to light and to sugars in leaves of Arabidopsis and other plant species." *Plant Physiol* 133(2): 838-849.
- Hennen-Bierwagen, T. A., Q. Lin, et al. (2009). "Proteins from multiple metabolic pathways associate with starch biosynthetic enzymes in high molecular weight complexes: a model for regulation of carbon allocation in maize amyloplasts." *Plant Physiol* 149(3): 1541-1559.
- Hennen-Bierwagen, T. A., F. Liu, et al. (2008). "Starch biosynthetic enzymes from developing maize endosperm associate in multisubunit complexes." *Plant Physiol* 146(4): 1892-1908.
- Hirose, T., G. N. Scofield, et al. (2008). "An expression analysis profile for the entire sucrose synthase gene family in rice." *Plant Science* 174(5): 534-543.
- Hirose, T. and T. Terao (2004). "A comprehensive expression analysis of the starch synthase gene family in rice (*Oryza sativa* L.)." *Planta* 220(1): 9-16.
- Hite, D. R., C. Auh, et al. (1999). "Catalase activity and hydrogen peroxide levels are inversely correlated in maize scutella during seed germination." *Redox Rep* 4(1-2): 29-34.
- Ho, L. C. (1988). "Metabolism and Compartmentation of Imported Sugars in Sink Organs in Relation to Sink Strength." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 39: 355-378.
- Horst, I., T. Welham, et al. (2007). "TILLING mutants of *Lotus japonicus* reveal that nitrogen assimilation and fixation can occur in the absence of nodule-enhanced sucrose synthase." *Plant Physiol* 144(2): 806-820.
- Hosahalli, R. and R. Esmaeil (2003). *Structure and Composition of Cereal Grains and Legumes. Handbook of Postharvest Technology*, CRC Press: 1-16.
- Huang, D. Y. and A. Y. Wang (1998). "Purification and characterization of sucrose synthase isozymes from etiolated rice seedlings." *Biochem Mol Biol Int* 46(1): 107-113.
- Huang, J. W., J. T. Chen, et al. (1996). "Complete structures of three rice sucrose synthase isogenes and differential regulation of their expressions." *Biosci Biotechnol Biochem* 60(2): 233-239.

- Huber, S. C., J. L. Huber, et al. (1996). "Phosphorylation of serine-15 of maize leaf sucrose synthase. Occurrence in vivo and possible regulatory significance." *Plant Physiol* 112(2): 793-802.
- Jacob, C., I. Knight, et al. (2006). "Aspects of the biological redox chemistry of cysteine: from simple redox responses to sophisticated signalling pathways." *Biol Chem* 387(10-11): 1385-1397.
- Jacobsen, J. V. and J. E. Varner (1967). "Gibberellic Acid-induced synthesis of protease by isolated aleurone layers of barley." *Plant Physiol* 42(11): 1596-1600.
- Jacquot, J. P., R. Rivera-Madrid, et al. (1994). "Arabidopsis thaliana NAPHP thioredoxin reductase. cDNA characterization and expression of the recombinant protein in Escherichia coli." *J Mol Biol* 235(4): 1357-1363.
- James, M. G., K. Denyer, et al. (2003). "Starch synthesis in the cereal endosperm." *Curr Opin Plant Biol* 6(3): 215-222.
- Javed, M. M., S. Zahoor, et al. (2012). "Wheat bran as a brown gold: Nutritious value and its biotechnological applications." *African Journal of Microbiology Research* 6(4): 724-733.
- Jerkovic, A., A. M. Kriegel, et al. (2010). "Strategic Distribution of Protective Proteins within Bran Layers of Wheat Protects the Nutrient-Rich Endosperm." *Plant Physiology* 152(3): 1459-1470.
- Joo, J. H., Y. S. Bae, et al. (2001). "Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism." *Plant Physiol* 126(3): 1055-1060.
- Kirchberger, S., J. Tjaden, et al. (2008). "Characterization of the Arabidopsis Brittle1 transport protein and impact of reduced activity on plant metabolism." *The Plant Journal* 56(1): 51-63.
- Kirchsteiger, K., J. Ferrandez, et al. (2012). "NADPH thioredoxin reductase C is localized in plastids of photosynthetic and nonphotosynthetic tissues and is involved in lateral root formation in Arabidopsis." *Plant Cell* 24(4): 1534-1548.
- Kobrehel, K., J. H. Wong, et al. (1992). "Specific reduction of wheat storage proteins by thioredoxin h." *Plant Physiol* 99(3): 919-924.
- Kobrehel, K., B. C. Yee, et al. (1991). "Role of the NADP/thioredoxin system in the reduction of alpha-amylase and trypsin inhibitor proteins." *J Biol Chem* 266(24): 16135-16140.
- Koch, K. (2004). "Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development." *Curr Opin Plant Biol* 7(3): 235-246.
- Koch, K. E. (1996). "CARBOHYDRATE-MODULATED GENE EXPRESSION IN PLANTS." *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 509-540.
- Koch, K. E., K. D. Nolte, et al. (1992). "Sugar Levels Modulate Differential Expression of Maize Sucrose Synthase Genes." *Plant Cell* 4(1): 59-69.
- Koch, K. E., Z. Ying, et al. (2000). "Multiple paths of sugar-sensing and a sugar/oxygen overlap for genes of sucrose and ethanol metabolism." *J Exp Bot* 51 Spec No: 417-427.

- Komatsu, A., T. Moriguchi, et al. (2002). "Analysis of sucrose synthase genes in citrus suggests different roles and phylogenetic relationships." *J Exp Bot* 53(366): 61-71.
- Komina, O., Y. Zhou, et al. (2002). "In vivo and in vitro phosphorylation of membrane and soluble forms of soybean nodule sucrose synthase." *Plant Physiol* 129(4): 1664-1673.
- Konopka-Postupolska, D., G. Clark, et al. (2009). "The role of annexin 1 in drought stress in Arabidopsis." *Plant Physiol* 150(3): 1394-1410.
- Kouchi, H., K. Takane, et al. (1999). "Rice ENOD40: isolation and expression analysis in rice and transgenic soybean root nodules." *Plant J* 18(2): 121-129.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-685.
- Laloi, C., N. Rayapuram, et al. (2001). "Identification and characterization of a mitochondrial thioredoxin system in plants." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(24): 14144-14149.
- Landberg, R., A. Kamal-Eldin, et al. (2008). "Localization of alkylresorcinols in wheat, rye and barley kernels." *Journal of Cereal Science* 48(2): 401-406.
- Larkin, M. A., G. Blackshields, et al. (2007). "Clustal W and Clustal X version 2.0." *Bioinformatics* 23(21): 2947-2948.
- Lee, S. K., S. K. Hwang, et al. (2007). "Identification of the ADP-glucose pyrophosphorylase isoforms essential for starch synthesis in the leaf and seed endosperm of rice (*Oryza sativa* L.)." *Plant Mol Biol* 65(4): 531-546.
- Lemoine, R. (2000). "Sucrose transporters in plants: update on function and structure." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1465(1-2): 246-262.
- Lepisto, A., S. Kangasjarvi, et al. (2009). "Chloroplast NADPH-thioredoxin reductase interacts with photoperiodic development in Arabidopsis." *Plant Physiol* 149(3): 1261-1276.
- Leprince, O., N. M. Atherton, et al. (1994). "The Involvement of Respiration in Free Radical Processes during Loss of Desiccation Tolerance in Germinating Zea mays L. (An Electron Paramagnetic Resonance Study)." *Plant Physiol* 104(4): 1333-1339.
- Leprince, O., G. A. F. Hendry, et al. (1993). "The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds." *Seed Science Research* 3(04): 231-246.
- Li, C. R., X. B. Zhang, et al. (2003). "Cloning, characterization and expression analysis of a sucrose synthase gene from tropical epiphytic orchid *Oncidium Goldiana*." *Physiologia Plantarum* 118(3): 352-360.
- Li, J., E. Baroja-Fernandez, et al. (2013). "Enhancing Sucrose Synthase Activity Results in Increased Levels of Starch and ADP-Glucose in Maize (*Zea mays* L.) Seed Endosperms." *Plant Cell Physiol* 54(2): 282-294.
- Lintala, M., Y. Allahverdiyeva, et al. (2007). "Structural and functional characterization of ferredoxin-NADP+-oxidoreductase using knock-out mutants of Arabidopsis." *Plant J* 49(6): 1041-1052.

- Lozovaya, V. V., O. A. Zabolina, et al. (1996). "Synthesis and Turnover of Cell-Wall Polysaccharides and Starch in Photosynthetic Soybean Suspension Cultures." *Plant Physiol* 111(3): 921-929.
- Lu, S., T. Li, et al. (2010). "Effects of salinity on sucrose metabolism during tomato fruit development." *African Journal of Biotechnology* 9(6): 842-849.
- Maeda, K., C. Finnie, et al. (2004). "Cy5 maleimide labelling for sensitive detection of free thiols in native protein extracts: identification of seed proteins targeted by barley thioredoxin h isoforms." *Biochem J* 378(Pt 2): 497-507.
- Marino, D., N. Hohnjec, et al. (2008). "Evidence for transcriptional and post-translational regulation of sucrose synthase in pea nodules by the cellular redox state." *Mol Plant Microbe Interact* 21(5): 622-630.
- Marx, C., J. H. Wong, et al. (2003). "Thioredoxin and germinating barley: targets and protein redox changes." *Planta* 216(3): 454-460.
- Mata-Cabana, A., F. J. Florencio, et al. (2007). "Membrane proteins from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 interacting with thioredoxin." *Proteomics* 7(21): 3953-3963.
- Matic, S., H. E. Akerlund, et al. (2004). "Sucrose synthase isoforms in cultured tobacco cells." *Plant Physiol Biochem* 42(4): 299-306.
- McDonald, #160, et al. (1999). Seed deterioration : physiology, repair and assessment. Zürich, SUISSE, International Seed Testing Association.
- Meyer, Y., J. P. Reichheld, et al. (2005). "Thioredoxins in Arabidopsis and other plants." *Photosynth Res* 86(3): 419-433.
- Michalska, J., H. Zauber, et al. (2009). "NTRC links built-in thioredoxin to light and sucrose in regulating starch synthesis in chloroplasts and amyloplasts." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(24): 9908-9913.
- Michelet, L., M. Zaffagnini, et al. (2006). "Thioredoxins, glutaredoxins, and glutathionylation: new crosstalks to explore." *Photosynth Res* 89(2-3): 225-245.
- Mikola, L. and J. Mikola (1980). "Mobilization of proline in the starchy endosperm of germinating barley grain." *Planta* 149(2): 149-154.
- Mittler, R., S. Vanderauwera, et al. (2004). "Reactive oxygen gene network of plants." *Trends Plant Sci* 9(10): 490-498.
- Montrichard, F., F. Alkhalifioui, et al. (2009). "Thioredoxin targets in plants: the first 30 years." *J Proteomics* 72(3): 452-474.
- Moon, J. C., H. H. Jang, et al. (2006). "The C-type Arabidopsis thioredoxin reductase ANTR-C acts as an electron donor to 2-Cys peroxiredoxins in chloroplasts." *Biochem Biophys Res Commun* 348(2): 478-484.
- Morell, M. and L. Copeland (1985). "Sucrose synthase of soybean nodules." *Plant Physiol* 78(1): 149-154.

- Munoz, F. J., E. Baroja-Fernandez, et al. (2005). "Sucrose synthase controls both intracellular ADP glucose levels and transitory starch biosynthesis in source leaves." *Plant Cell Physiol* 46(8): 1366-1376.
- Murata, T., T. Sugiyama, et al. (1966). "Enzymic mechanism of starch synthesis in ripening rice grains. 3. Mechanism of the sucrose-starch conversion." *Arch Biochem Biophys* 113(1): 34-44.
- Mustacich, D. and G. Powis (2000). "Thioredoxin reductase." *Biochem J* 346 Pt 1: 1-8.
- Nakai, T., T. Konishi, et al. (1998). "An increase in apparent affinity for sucrose of mung bean sucrose synthase is caused by in vitro phosphorylation or directed mutagenesis of Ser11." *Plant Cell Physiol* 39(12): 1337-1341.
- Nakai, T., N. Tonouchi, et al. (1997). "Expression and characterization of sucrose synthase from mung bean seedlings in *Escherichia coli*." *Biosci Biotechnol Biochem* 61(9): 1500-1503.
- Neuhaus, H. E. and M. J. Emes (2000). "NONPHOTOSYNTHETIC METABOLISM IN PLASTIDS." *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51: 111-140.
- Neuhaus, H. E., R. E. Hausler, et al. (2005). "No need to shift the paradigm on the metabolic pathway to transitory starch in leaves." *Trends Plant Sci* 10(4): 154-156; author reply 156-158.
- Neuhaus, H. E., G. Henrichs, et al. (1995). "Starch degradation in intact amyloplasts isolated from cauliflower floral buds (*Brassica oleracea* L.)." *Planta* 195(4): 496-504.
- Nguyen-Quoc, B., M. Krivitzky, et al. (1990). "Sucrose Synthase in Developing Maize Leaves: Regulation of Activity by Protein Level during the Import to Export Transition." *Plant Physiol* 94(2): 516-523.
- Nishizawa, A., R. Wolosiuk, et al. (1979). "Chloroplast phenylalanine ammonia-lyase from spinach leaves." *Planta* 145(1): 7-12.
- Oelze, M. L., A. Kandlbinder, et al. (2008). "Redox regulation and overreduction control in the photosynthesizing cell: complexity in redox regulatory networks." *Biochim Biophys Acta* 1780(11): 1261-1272.
- Okita, T. W. (1992). "Is there an alternative pathway for starch synthesis?" *Plant Physiol* 100(2): 560-564.
- Oliveira do Nascimento, J. R., B. R. Cordenunsi, et al. (2000). "Sucrose Synthase Activity and Expression during Development and Ripening in Bananas." *Journal of Plant Physiology* 156(5-6): 605-611.
- Olsen, O.-A. (2004). "Nuclear Endosperm Development in Cereals and *Arabidopsis thaliana*." *The Plant Cell Online* 16(suppl 1): S214-S227.
- Oswald, O., T. Martin, et al. (2001). "Plastid redox state and sugars: interactive regulators of nuclear-encoded photosynthetic gene expression." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(4): 2047-2052.
- Pascual, M. B., A. Mata-Cabana, et al. (2010). "Overoxidation of 2-Cys peroxiredoxin in prokaryotes: cyanobacterial 2-Cys peroxiredoxins sensitive to oxidative stress." *J Biol Chem* 285(45): 34485-34492.

- Pei, Z. M., Y. Murata, et al. (2000). "Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells." *Nature* 406(6797): 731-734.
- Perez-Ruiz, J. M. and F. J. Cejudo (2009). "A proposed reaction mechanism for rice NADPH thioredoxin reductase C, an enzyme with protein disulfide reductase activity." *FEBS Lett* 583(9): 1399-1402.
- Perez-Ruiz, J. M., M. Gonzalez, et al. (2009). "The quaternary structure of NADPH thioredoxin reductase C is redox-sensitive." *Mol Plant* 2(3): 457-467.
- Perez-Ruiz, J. M., M. C. Spinola, et al. (2006). "Rice NTRC is a high-efficiency redox system for chloroplast protection against oxidative damage." *Plant Cell* 18(9): 2356-2368.
- Persia, D., G. Cai, et al. (2008). "Sucrose synthase is associated with the cell wall of tobacco pollen tubes." *Plant Physiol* 147(4): 1603-1618.
- Pontis, H. G., J. R. Babio, et al. (1981). "Reversible unidirectional inhibition of sucrose synthase activity by disulfides." *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(11): 6667-6669.
- Pozueta-Romero, J. and T. Akazawa (1993). "Biochemical mechanism of starch biosynthesis in amyloplasts from cultured cells of sycamore (*Acer pseudoplatanus*)." *J Exp Bot* 44: 297-306.
- Pozueta-Romero, J., M. Frehner, et al. (1991). "Direct transport of ADPglucose by an adenylate translocator is linked to starch biosynthesis in amyloplasts." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(13): 5769-5773.
- Pozueta-Romero, J., J. Yamaguchi, et al. (1991). "ADPG formation by the ADP-specific cleavage of sucrose-reassessment of sucrose synthase." *FEBS Lett* 291(2): 233-237.
- Preiss, J. (1988). Biosynthesis of starch and its regulation. *The Biochemistry of Plants*. J. Preiss. San Diego, CA, Academic Press. 14: 181-254.
- Pressey, R. (1969). "Potato sucrose synthetase: purification, properties, and changes in activity associated with maturation." *Plant Physiol* 44(5): 759-764.
- Pulido, P., R. Cazalis, et al. (2009). "An antioxidant redox system in the nucleus of wheat seed cells suffering oxidative stress." *Plant J* 57(1): 132-145.
- Pulido, P., F. Domínguez, et al. (2009). Chapter 14 Oxidative Stress and Thiol-Based Antioxidants in Cereal Seeds. *Advances in Botanical Research*. J. Jean-Pierre, Academic Press. Volume 52: 437-460.
- Pulido, P., M. C. Spinola, et al. (2010). "Functional analysis of the pathways for 2-Cys peroxiredoxin reduction in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts." *J Exp Bot* 61(14): 4043-4054.
- Regvar, M., D. Eichert, et al. (2011). "New insights into globoids of protein storage vacuoles in wheat aleurone using synchrotron soft X-ray microscopy." *J Exp Bot* 62(11): 3929-3939.
- Ricard, B., T. V. Toai, et al. (1998). "Evidence for the critical role of sucrose synthase for anoxic tolerance of maize roots using a double mutant." *Plant Physiol* 116(4): 1323-1331.

- Rock, C. and R. S. Quatrano (1995). The role of hormones during seed development. *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. P. Davies. Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers: 671-697.
- Rohrig, H., M. John, et al. (2004). "Modification of soybean sucrose synthase by S-thiolation with ENOD40 peptide A." *Biochem Biophys Res Commun* 325(3): 864-870.
- Romer, U., H. Schrader, et al. (2004). "Expression, purification and characterization of recombinant sucrose synthase 1 from *Solanum tuberosum* L. for carbohydrate engineering." *J Biotechnol* 107(2): 135-149.
- Ross, H. A. and H. V. Davies (1992). "Purification and Characterization of Sucrose Synthase from the Cotyledons of *Vicia faba* L." *Plant Physiol* 100(2): 1008-1013.
- Ruan, Y. L., D. J. Llewellyn, et al. (2003). "Suppression of sucrose synthase gene expression represses cotton fiber cell initiation, elongation, and seed development." *Plant Cell* 15(4): 952-964.
- Sabelli, P. A. and B. A. Larkins (2009). "The development of endosperm in grasses." *Plant Physiol* 149(1): 14-26.
- Salanoubat, M. and G. Belliard (1989). "The steady-state level of potato sucrose synthase mRNA is dependent on wounding, anaerobiosis and sucrose concentration." *Gene* 84(1): 181-185.
- Salmenkallio, M. and T. Sopanen (1989). "Amino Acid and Peptide uptake in the scutella of germinating grains of barley, wheat, rice, and maize." *Plant Physiol* 89(4): 1285-1291.
- Salnikov, V. V., M. J. Grimson, et al. (2003). "Localization of sucrose synthase and callose in freeze-substituted secondary-wall-stage cotton fibers." *Protoplasma* 221(3-4): 175-184.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour, New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Sasaki, Y., A. Kozaki, et al. (1997). "Link between light and fatty acid synthesis: thioredoxin-linked reductive activation of plastidic acetyl-CoA carboxylase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(20): 11096-11101.
- Schafer, W. E., J. M. Rohwer, et al. (2005). "Partial purification and characterisation of sucrose synthase in sugarcane." *J Plant Physiol* 162(1): 11-20.
- Schupp, N. and P. Ziegler (2004). "The relation of starch phosphorylases to starch metabolism in wheat." *Plant Cell Physiol* 45(10): 1471-1484.
- Schurmann, P. and J. P. Jacquot (2000). "PLANT THIOREDOXIN SYSTEMS REVISITED." *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51: 371-400.
- Sebkova, V., C. Unger, et al. (1995). "Biochemical, physiological, and molecular characterization of sucrose synthase from *Daucus carota*." *Plant Physiol* 108(1): 75-83.
- Serrato, A. J. and F. J. Cejudo (2003). "Type-h thioredoxins accumulate in the nucleus of developing wheat seed tissues suffering oxidative stress." *Planta* 217(3): 392-399.

- Serrato, A. J., J. M. Perez-Ruiz, et al. (2002). "Cloning of thioredoxin h reductase and characterization of the thioredoxin reductase-thioredoxin h system from wheat." *Biochem J* 367(Pt 2): 491-497.
- Serrato, A. J., J. M. Perez-Ruiz, et al. (2004). "A novel NADPH thioredoxin reductase, localized in the chloroplast, which deficiency causes hypersensitivity to abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*." *J Biol Chem* 279(42): 43821-43827.
- Shahpiri, A., B. Svensson, et al. (2008). "The NADPH-dependent thioredoxin reductase/thioredoxin system in germinating barley seeds: gene expression, protein profiles, and interactions between isoforms of thioredoxin h and thioredoxin reductase." *Plant Physiol* 146(2): 789-799.
- Shannon, J. C., F. M. Pien, et al. (1998). "Brittle-1, an adenylate translocator, facilitates transfer of extraplastidial synthesized ADP--glucose into amyloplasts of maize endosperms." *Plant Physiol* 117(4): 1235-1252.
- Shaw, J. R., R. J. Ferl, et al. (1994). "Structural features of the maize *sus1* gene and protein." *Plant Physiol* 106(4): 1659-1665.
- Shewry, P. R. and N. G. Halford (2002). "Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization." *J Exp Bot* 53(370): 947-958.
- Sikka, V. K., S.-B. Choi, et al. (2001). "Subcellular compartmentation and allosteric regulation of the rice endosperm ADPglucose pyrophosphorylase." *Plant Science* 161(3): 461-468.
- Silvius, J. E. and F. W. Snyder (1979). "Comparative Enzymic Studies of Sucrose Metabolism in the Taproots and Fibrous Roots of *Beta vulgaris* L." *Plant Physiol* 64(6): 1070-1073.
- Sivak, M. N. and J. Preiss, Eds. (1998). *Starch: Basic Science to Biotechnology. Advances in Food and Nutrition Research*, Academic Press.
- Smith, A. M., K. Denyer, et al. (1997). "THE SYNTHESIS OF THE STARCH GRANULE." *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 67-87.
- Sopanen, T., M. Uuskallio, et al. (1980). "Characteristics and development of leucine transport activity in the scutellum of germinating barley grain." *Plant Physiol* 65(2): 249-253.
- Stenbaek, A., A. Hansson, et al. (2008). "NADPH-dependent thioredoxin reductase and 2-Cys peroxiredoxins are needed for the protection of Mg-protoporphyrin monomethyl ester cyclase." *FEBS Lett* 582(18): 2773-2778.
- Stenbaek, A. and P. E. Jensen (2010). "Redox regulation of chlorophyll biosynthesis." *Phytochemistry* 71(8-9): 853-859.
- Stitt, M. and H. W. Heldt (1981). "Simultaneous synthesis and degradation of starch in spinach chloroplasts in the light." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 638(1): 1-11.
- Strand, A., V. Hurry, et al. (1997). "Development of *Arabidopsis thaliana* leaves at low temperatures releases the suppression of photosynthesis and photosynthetic gene expression despite the accumulation of soluble carbohydrates." *Plant J* 12(3): 605-614.

- Streb, S., B. Egli, et al. (2009). "The debate on the pathway of starch synthesis: a closer look at low-starch mutants lacking plastidial phosphoglucomutase supports the chloroplast-localized pathway." *Plant Physiol* 151(4): 1769-1772.
- Studier, F. W. and B. A. Moffatt (1986). "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes." *J Mol Biol* 189(1): 113-130.
- Su, J. C. and J. Preiss (1978). "Purification and properties of sucrose synthase from maize kernels." *Plant Physiol* 61(3): 389-393.
- Subbaiah, C. C., A. Palaniappan, et al. (2006). "Mitochondrial localization and putative signaling function of sucrose synthase in maize." *J Biol Chem* 281(23): 15625-15635.
- Sun, Z. T. and C. A. Henson (1991). "A quantitative assessment of the importance of barley seed alpha-amylase, beta-amylase, debranching enzyme, and alpha-glucosidase in starch degradation." *Arch Biochem Biophys* 284(2): 298-305.
- Surget, A. and C. Barron (2005). *Histologie du grain de blé*. Paris, FRANCE, Association pour le progrès des industries céréalières.
- Sweetlove, L. J., M. M. Burrell, et al. (1996). "Starch metabolism in tubers of transgenic potato (*Solanum tuberosum*) with increased ADPglucose pyrophosphorylase." *Biochem J* 320 (Pt 2): 493-498.
- Taliercio, E. W. and P. S. Chourey (1989). "Post-transcriptional control of sucrose synthase expression in anaerobic seedlings of maize." *Plant Physiol* 90(4): 1359-1364.
- Tanase, K. and S. Yamaki (2000). "Purification and characterization of two sucrose synthase isoforms from Japanese pear fruit." *Plant Cell Physiol* 41(4): 408-414.
- Tetlow, I. J., K. G. Beisel, et al. (2008). "Analysis of protein complexes in wheat amyloplasts reveals functional interactions among starch biosynthetic enzymes." *Plant Physiol* 146(4): 1878-1891.
- Tetlow, I. J., M. K. Morell, et al. (2004). "Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants." *J Exp Bot* 55(406): 2131-2145.
- Tetlow, I. J., R. Wait, et al. (2004). "Protein phosphorylation in amyloplasts regulates starch branching enzyme activity and protein-protein interactions." *Plant Cell* 16(3): 694-708.
- Thorne, J. H. (1985). "Phloem Unloading of C and N Assimilates in Developing Seeds." *Annual Review of Plant Physiology* 36: 317-343.
- Tickle, P., M. M. Burrell, et al. (2009). "Characterization of plastidial starch phosphorylase in *Triticum aestivum* L. endosperm." *J Plant Physiol* 166(14): 1465-1478.
- Towbin, H., T. Staehelin, et al. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9): 4350-4354.
- van de Sande, K., K. Pawlowski, et al. (1996). "Modification of phytohormone response by a peptide encoded by ENOD40 of legumes and a nonlegume." *Science* 273(5273): 370-373.

- Vincze, T., J. Posfai, et al. (2003). "NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes." *Nucleic Acids Res* 31(13): 3688-3691.
- Wang, A. Y., M. H. Kao, et al. (1999). "Differentially and developmentally regulated expression of three rice sucrose synthase genes." *Plant Cell Physiol* 40(8): 800-807.
- Winter, H., J. L. Huber, et al. (1997). "Membrane association of sucrose synthase: changes during the graviresponse and possible control by protein phosphorylation." *FEBS Lett* 420(2-3): 151-155.
- Winter, H., J. L. Huber, et al. (1998). "Identification of sucrose synthase as an actin-binding protein." *FEBS Lett* 430(3): 205-208.
- Winter, H. and S. C. Huber (2000). "Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes." *Crit Rev Biochem Mol Biol* 35(4): 253-289.
- Wong, J. H., Y. Balmer, et al. (2003). "Unraveling thioredoxin-linked metabolic processes of cereal starchy endosperm using proteomics." *FEBS Lett* 547(1-3): 151-156.
- Wong, J. H., N. Cai, et al. (2004). "Thioredoxin targets of developing wheat seeds identified by complementary proteomic approaches." *Phytochemistry* 65(11): 1629-1640.
- Wong, J. H., Y. B. Kim, et al. (2002). "Transgenic barley grain overexpressing thioredoxin shows evidence that the starchy endosperm communicates with the embryo and the aleurone." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(25): 16325-16330.
- Yano, H. and M. Kuroda (2006). "Disulfide proteome yields a detailed understanding of redox regulations: a model study of thioredoxin-linked reactions in seed germination." *Proteomics* 6(1): 294-300.
- Yen, S. F., J. C. Su, et al. (1994). "Purification and characterization of rice sucrose synthase isozymes." *Biochem Mol Biol Int* 34(3): 613-620.
- Zeeman, S. C., J. Kossmann, et al. (2010). "Starch: its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants." *Annu Rev Plant Biol* 61: 209-234.
- Zeeman, S. C., S. M. Smith, et al. (2007). "The diurnal metabolism of leaf starch." *Biochem J* 401(1): 13-28.
- Zeeman, S. C., A. Tiessen, et al. (2002). "Starch synthesis in Arabidopsis. Granule synthesis, composition, and structure." *Plant Physiol* 129(2): 516-529.
- Zeeman, S. C., T. Umemoto, et al. (1998). "A mutant of Arabidopsis lacking a chloroplastic isoamylase accumulates both starch and phytoglycogen." *Plant Cell* 10(10): 1699-1712.
- Zeng, Y., Y. Wu, et al. (1998). "Differential regulation of sugar-sensitive sucrose synthases by hypoxia and anoxia indicate complementary transcriptional and posttranscriptional responses." *Plant Physiol* 116(4): 1573-1583.
- Zervosen, A., U. Römer, et al. (1998). "Application of recombinant sucrose synthase-large scale synthesis of ADP-glucose." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 5(1-4): 25-28.
- Zhang, X.-Q. and R. Chollet (1997). "Seryl-phosphorylation of soybean nodule sucrose synthase (nodulin-100) by a Ca²⁺-dependent protein kinase." *FEBS Letters* 410(2-3): 126-130.

- Zhang, X. Q., A. A. Lund, et al. (1999). "Soybean nodule sucrose synthase (nodulin-100): further analysis of its phosphorylation using recombinant and authentic root-nodule enzymes." *Arch Biochem Biophys* 371(1): 70-82.
- Zheng, Y., S. Anderson, et al. (2011). "The structure of sucrose synthase-1 from *Arabidopsis thaliana* and its functional implications." *J Biol Chem* 286(41): 36108-36118.
- Zrenner, R., M. Salanoubat, et al. (1995). "Evidence of the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.)." *Plant J* 7(1): 97-107.